

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zytophotometrischer Beitrag zum
Wirkungsprinzip des Östradiol auf
die Rattenleber

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Marlene Witek
aus Trier

Mainz 1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zytophotometrischer Beitrag zum
Wirkungsprinzip des Östradiol auf
die Rattenleber

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Marlene Witek
aus Trier

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Prof. Dr. R. Wolf

Referent: Prof. Dr. J. Löhr

Korreferent: Prof. Dr. W.E.G. Müller

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	6
Ergebnisse	11
Diskussion	32
Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	48
Lebenslauf	67



EINLEITUNG

Hormone stellen spezifische organische Substanzen dar, die, von bestimmten Organen oder Geweben gebildet, über das Blut, den Liquor cerebrospinalis oder den Nervenweg zu ihrem Wirkungsort gelangen und dort primär-regulierend in Stoffwechselvorgänge eingreifen.

Nach SCHULTZ (1972) unterliegt die Funktion der meisten Zellen des Organismus hormonellen Regulationen. Über den intrazellulären Wirkungsmechanismus der Mehrzahl der Hormone ist noch wenig bekannt. Neben einer Aktivierung von Enzymen oder Enzymsystemen werden Veränderungen der Permeabilität von Zellmembranen, die Induktion der genom-abhängigen Biosynthese von spezifischer mRNA und die Stimulierung einer Protein-de-novo-Biosynthese beschrieben (WEISBECKER, 1970). Dies trifft sowohl für die Steroidhormone als auch für die biogenen Amine und die cAMP-abhängigen Polypeptidhormone zu (SCHULTZ, 1972).

Nach dem Modell von JACOB und MONOD (1961) stellt die DNA als Träger der genetischen Information die Matrize für die Bildung spezifischer mRNA dar. An einer definierten Stelle der DNA, dem Promotor, wird die Transkription begonnen, d.h. an diese Stelle heftet sich die RNA-Polymerase und bewegt sich an der DNA entlang. Verantwortlich für die Struktur der zu bildenden Proteine ist das Strukturgen, das mit dem Operatorgen zusammen eine Funktionseinheit, das Operon, bildet. Die Aktivität des Operons steht unter Kontrolle des Regulatorgens. Die Regulation vollzieht sich in der Weise, daß das Regulatorgen eine mRNA bildet, deren Syntheseprodukt ein Repressor ist, welcher die Aktivität des Operatorgens unterdrückt. Bei Anwesenheit eines spezifischen Substrates reagieren die Substratmoleküle mit dem Repressor und inaktivieren ihn. Der Repressor verän-

dert dadurch seine Gestalt und löst sich von der DNA, welche nun für die Transkription zur Verfügung steht. Substrate, die auf diese Weise Enzyme induzieren, werden auch Induktoren genannt.

Hormone sollen durch Bindung an die Repressoren die Funktion solcher Induktoren einnehmen, indem sie die DNA de-reprimieren und über den Weg der Transkription die Proteinbiosynthese in Gang setzen. Nach HARBERS (1969) können Hormone als allosterische Effektoren betrachtet werden.

Auch für das Steroidhormon Östrogen, zu dessen wirksamsten Vertretern das Östradiol-17 β zählt, liegen noch keine abschließenden Ergebnisse über seinen molekularbiologischen Wirkungsmechanismus vor. Das Hormon wird in den Theca-granulosa-Zellen des Ovars, in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens und während der Gravidität zusätzlich in der Plazenta gebildet. Darüberhinaus produziert die NNR das Hormon in biologisch bedeutungslosen Mengen. Die für die Biosynthese des Östradiols notwendige Vorstufe stellt das Testosteron dar, welches durch Oxydation am C 19 und anschließende Abspaltung dieses C-Atoms in Östradiol übergeht.

Zu den Erfolgsorganen der Östrogene bei Mensch und Tier gehören in erster Linie das Endo- und Myometrium des Uterus sowie die Eileiter. Während das Östrogen bei noch nicht ausgereiften Individuen für das Wachstum von Ovarien, Tuben, Uterus und Vagina von entscheidender Bedeutung ist, benötigt der geschlechtsreife Organismus das Sexualhormon zur Funktionserhaltung der Genitalorgane. Der regulierende Einfluß dieser Hormongruppe auf die Proteinbiosynthese im Rattenuterus drückt sich in einer Stimulierung der RNA-Biosynthese (BILLING et al, 1969b; HAMILTON et al, 1968b) über eine Zunahme der RNA-Polymeraseaktivität (GLASSER et al, 1972) und einer daraus

resultierenden gesteigerten Proteinbiosynthese aus (HAMILTON, 1968). Dabei soll das Östrogen mit Hilfe eines in zwei Etappen ablaufenden Transportmechanismus in den Zellkern gelangen (JENSEN et al, 1968) und dort durch die Synthese von Nicht-Histon-Proteinen die durch Histone blockierte RNA-Synthese in Gang setzen (TENG und HAMILTON, 1969). Der Nachweis einer östrogenstimulierten gesteigerten genetischen Aktivität gelang COX et al (1973) an den Eileitern von Kühen, bei denen unter Hormoneinfluß eine Aktivitätssteigerung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase beobachtet wurde. Auch die Brustdrüse weist eine hohe Affinität zum Östradiol auf, wie GARDNER und WITLIFF (1973) am Beispiel von Ratten demonstrieren konnten.

Neben diesen genitalen Wirkungen zeichnet sich das Östradiol durch einen hohen Hepatotropismus aus. In den Lebern von Kröten wurde durch Östrogenstimulation ein Anstieg der Synthese des Dotterproteins Lipovitellin erzielt (WITLIFF und KENNEY, 1972; WITLIFF et al, 1972). Ein ähnliches Verhalten ist an der Leber von Hühnern zu beobachten, die auf Östrogenzufuhr mit der Bildung eines spezifischen Dotterproteins, des Phosvitins, reagiert (GREENGARD et al, 1965; JAILKHANI und TALWAR, 1972). Auch in der Leber zeigt sich nach der intranukleären Hormonbildung (GSCHWENDT und KITSTEIN, 1974) eine spezifische mRNA-Synthese (COOLSMA und GRUBER, 1968), die ihrerseits die Bildung von Phosvitin induziert.

Erstaunlicherweise entfalten auch die Lebern von Säugetieren eine große Affinität zum Östradiol. So wies HAMILTON (1968) eine substantielle Bindung des Östradiols an das Chromatin von Leberzellkernen ovariectomierter Ratten nach. GUSTAFSSON und INGELMAN-SUNDBERG (1974) beobachteten an den Lebern östradiol-behandelter

Ratten die Induktion bestimmter Enzymsysteme. Ähnliche Aussagen konnten BRAIDMAN und ROSE (1971) treffen. Am Beispiel des Steroidhormons Cortisol, welches, wie auch das Östradiol, an einen spezifischen Rezeptor im Cytosol der Leberzelle gebunden wird, demonstrieren GOPALAKRISHNAN und SADGOPAL (1972), daß die Steroidhormone ihre Wirkung vermutlich auf der Transkriptionsebene ausüben. Die Ergebnisse von LÖHR (1973) bestätigen diese Aussage.

Die Erkenntnis, daß die Mehrzahl der Steroidhormone und insbesondere das Östradiol in der Leber verschiedener Lebewesen die Matrizenaktivität der nukleären DNA entscheidend beeinflussen, ohne daß ihr primärer Angriffspunkt an den Funktionsstrukturen des Zellkerns bekannt ist, führte zu der Frage, ob mittels einer geeigneten fluoreszenzzytometrischen Methode etwas zu diesem Problem beigetragen werden könnte.

Unter hormoneller Stimulierung erfahren die Funktionsstrukturen des Zellkerns eine Verschiebung des labilen Funktionsgleichgewichtes Heterochromatin - Euchromatin zugunsten des aktiven, sich durch eine hohe RNA-Polymeraseaktivität auszeichnenden Euchromatins (SANDRITTER, 1970). Nach FRENSTER (1965) wird die genetische Aktivität der DNA durch eine Gruppe basischer nukleärer Proteine, der Histone, blockiert, welche entlang den Nukleoproteidketten mit den DNA-Phosphatgruppen assoziiert sind. Um unter Hormonstimulation zu einer erhöhten RNA-Polymeraseaktivität zu gelangen, bedarf es einer Derepression der durch die Histone blockierten Genorte.

Die Änderung der Östradiol-induzierten Matrizenaktivität der DNA und die möglichen strukturellen Änderungen der nukleären DNA-Reaktionspartner sollten durch eine qualitative biochemische Bestimmung der DNA und ihrer Reaktionspartner untersucht werden. Der zytophoto-

metrische Nachweis von DNA und basischen Kernproteinen gelingt mit den Farbstoffen Acridinorange (AO) und Phenanthrenchinon (PQ). Das AO lagert sich den sog. "freien DNA-PO₄-Gruppen" an, während das PQ die Argininresiduen in Geweben spezifisch bindet. Der PQ-Färbung wird zur Ermittlung des Gesamthistongehaltes die Fastgreen FCF-Färbung beigeordnet, welche eine Aussage über den Metabolismus und über strukturelle Veränderungen dieser Eiweißkörper erlaubt. Die Feulgen-Nukleal-Reaktion ermöglicht die Erfassung des nukleären DNA-Gehaltes und gestattet es, den DNA-Metabolismus unter Hormonstimulation beurteilen zu können.

Die Östradiol-induzierten Veränderungen am Nukleoproteid des Leberzellkernes der Rattenleber sollen in der vorliegenden Untersuchung anhand der Acridinorange-, Phenanthrenchinon-, Fastgreen FCF- und Feulgen-Färbung dargestellt werden.

MATERIAL UND METHODE

Materialgewinnung

Der Untersuchung dienten diploide Interphase-Leberzellkerne von insgesamt 24 Wistar-Ratten (Albino), davon 12 männliche und 12 weibliche Tiere. Die Tiere erhielten eine Standardkost und Wasser ad libitum. Dieses Tierkontingent wurde in 3 gleichstarke Untergruppen aufgeteilt, wobei jede dieser Untergruppen aus 3 männlichen und 3 weiblichen Versuchstieren und 1 männlichen und 1 weiblichen Kontrolltier bestand. Es erhielten je 6 Versuchstiere über eine Dauer von 6 Tagen 1 mg, 5 mg oder 10 mg Östradiolbenzoat (Präparat Progynon B oleosum, Schering) intramuskulär. 2 weibliche Versuchstiere aus der Dosierungsgruppe III (10 mg Östradiolbenzoat/die) verstarben vor der letzten Injektion. Die Tötung der übrigen Tiere erfolgte am 6. Versuchstag 3 h nach der letzten Injektion durch Dekapitation. Nach der Entnahme der Leber wurde von der sagittalen Schnittfläche des linken Leberlappens mit einem geschliffenen Objektträger ein Zellabstrich entnommen. Anschließend wurden die abgestrichenen Zellen zwischen zwei gereinigten Objektträgern zerquetscht und mit der Kante eines Objektträgers auf einem zweiten, fluoreszenzfreien (Firma Kindler, Freiburg i. Brsg.) ausgestrichen. Auf diese Weise wurden pro Tier 8 Ausstriche hergestellt. Nach 10 min Lufttrocknung wurden diese in 10%-igem, neutral gepuffertem Formalin bei +4, 0 Grad Celsius im Kühlschrank (Phenanthrenchinon) oder bei -6, 0 Grad Celsius trocken über Silikagel aufbewahrt (Acridinorange-Reaktion). Ein Teil der Präparate wurde einer 1-stündigen Fixierung in 96%-igem Alkohol (Feulgen- und Fastgreen-FCF) unterzogen und anschließend bei -6, 0 Grad Celsius trocken über Silikagel aufbewahrt. Die Fixierungsdauer betrug maximal 24 Stunden.

Färbungen

Die histochemische Färbung erfolgte mit jeweils zwei Präparaten von allen Tieren aus jeder Untergruppe. Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

A. die Acridinorange-Färbung nach der von RIGLER (1966) angegebenen Methode:

1. Pyridin wasserfrei 5 min;
2. Pyridin: Essigsäureanhydrid 3:2 15 min;
3. Äthanol 100%; 96%; 60%; 30%; jeweils 5 min;
4. Aqua bidest 3 min;
5. Citrat- Na_2HPO_4 -Puffer pH 4, 1 5 min;
6. Citrat- Na_2HPO_4 -Puffer pH 4, 1 und AO 10^{-4} m 15 min;
7. Citrat-Phosphat-Puffer pH 4, 1 3x jeweils 5 min.

B. die Phenanthrenchinon-Färbung nach der von MAGUN und KELLY (1969) beschriebenen Methode:

1. Wässern der formalinfixierten Ausstrichpräparate für eine Stunde;
2. Alkohol 70%-ig 5 min;
3. Alkohol 100%-ig abs. 5 min;
4. Xylol 5 min;
5. Alkohol 100%-ig abs. 3 x 1 min;
6. Färbung mit Phenanthrenchinon 10 min, welches folgendermaßen frisch zubereitet wurde:
2, 0 ml 5n NaOH, 18, 0 ml Aqua dest., 80, 0 ml Äthanol 100%-ig;
hinzugegeben wurden 200, 0 mg Phenanthrenchinon in 20, 0 ml Dimethylformamid;
7. Äthanol 100%-ig 3 x 1 min;

8. Alkohol 70%-ig 5 min;
9. Alkohol 30%-ig 5 min;
10. Aqua dest. 5 min.

C. die Fastgreen-FCF-Färbung nach der von NOESKE (1968) angewandten Methode:

1. Nachfixierung der Ausstrichpräparate in neutral gepuffertem 10%-igem Formalin 60 min;
2. Wässern der formalinfixierten Präparate 2h;
3. Hydrolyse mit 5%-iger Trichloressigsäure bei 90 Grad Celcius 15 min;
4. Alkohol 70%-ig 2 x 10 min;
5. Spülen in Aqua dest. pH 8, 1 (mit NaOH eingestellt) 10 min;
6. Färbung mit 0,1%-iger wässriger Fastgreen-Lösung pH 8, 1 30 min;
7. Differenzieren in alkalischem Aqua dest. pH 8, 1 (mit NaOH eingestellt) 3 x 1 min;
8. Aqua dest. pH 6, 5 (mit 0,1 nHCl eingestellt) 2 x 1 min;
9. Äthanol 100%-ig abs. 1 min;
10. Xylol 1 min.

D. die Feulgen-Nukleal-Reaktion nach der von D. MÜLLER (1966) angegebenen Methode:

1. Hydrolyse in 1 nHCl bei 60 Grad Celsius 12 min;
2. Schiff'sches Reagenz 60 min;
3. SO₂-Wasser 3 x 10 min;
4. Äthanol 30%-ig; 60%-ig; 70%-ig; 96%-ig jeweils 3 min;
5. Xylol 5 min.

Eingedeckt wurden die Präparate der AO-Färbung in Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,1 unter Belastung mit 2×10 g, die Präparate der PQ-Färbung mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 9 Teilen Glycerin und 2 Teilen 5 nNaOH. Demgegenüber erfolgte die Eindeckung der Präparate aus der Fastgreen-FCF- und der Feulgen-Färbung mittels Cargille-Oil, das einen Brechungsindex von $n = 1,54$ aufweist (Firma R.P. Cargille Laboratories Inc. Cedar Grove N.J. USA).

Mikrofluorometrische Messungen

Die mikrofluorometrischen Messungen wurden mit einem Mikroskop-photometer mit variabler Meßblende, MPV I, durchgeführt (Firma Leitz, Wetzlar). Der Aufbau erfolgte im wesentlichen nach BÖHM und SPRENGER (1968).

Durchlicht zur Objekteinstellung: Phasenkontrast (Kondensor nach HEINE, 1931); Ölimmersionsobjektiv Pv Fl 70 x N.A. 1,15; Nieder-voltage mit 5 V. Die Ausbleichung wurde durch Vorschaltung eines Interferenzbandverlaufsfilters 618 + 22 niedrig gehalten.

Optische Einrichtung: Ploem-Opak, Objektiv PvFl 70 x wie oben. Die Anregung des gebundenen Farbstoffes erfolgte durch einen Xenon Höchstdruckbrenner XBO, 150 W (Firma Osram, Berlin); Gleichrichtervorschaltgerät Typ VX 150f-2b-1 unter Vorschaltung eines Spannungskonstanthalters Typ EMK Vx (Dominit), beide Geräte Firma Siemens, Erlangen.

Wärmeschutzfilter BG 38, Zerstreuungsfiler NG₁, Erregerfilter für Acridinorange und Phenanthrenchinon UG₁, für Feulgen und Fastgreen-FCF BG_{12/3}; Sperrfilter für die Acridinorange-Färbung 510 nm, für die Phenanthrenchinon-Färbung 470 nm, für die Feulgen-Färbung 550 nm

und für die Fastgreen-FCF-Färbung 610 nm. Interferenzbandverlaufsfilter Veril a, Typ B-6, bei AO 2, 6; PQ 1, 6; Feulgen 3, 6; Fastgreen-FCF 4, 1 (alle Filter Firma Schott und Gen., Mainz).

Die Messung erfolgte mit monochromatischem Licht für die AO-Färbung bei 530 nm, für die PQ-Färbung bei 490 nm, für die Feulgen-Färbung bei 570 nm und für die Fastgreen-FCF-Färbung bei 620 nm. Meßeinrichtung S-20 Photokathode Typ 95 58A (Firma EMI, England). Spektrale Empfindlichkeit siehe DENKHAUS und HEIMER (1970). Lichtmeßeinrichtung Typ MFLK BN 5007 (Firma Knott, München). Die Saugspannung betrug für die Acridinorange- und Phenanthrenchinon-Färbung 1, 1 kV, für die Feulgen-Färbung 1, 3 kV und für die Fastgreen-Färbung 1, 4 kV. Als Meßinstrument diente ein Mikroamperemeter mit einem Meßbereich von 0, 0018 - 20 μ A/Skt. Gemessen wurde bei allen vier Färbungen bei 0, 002 μ A (Firma Norma, Wien, Österreich).

Pro Präparat, außer den Präparaten der Feulgen- und Fastgreen-FCF-Färbung mit jeweils nur 50 Kernen, wurden je 200 Leberzellkerne ausgewertet. Die Messung erfolgte rein zufällig; es war dabei nicht bekannt, ob das Präparat zur Versuchs- oder zur Kontrollgruppe gehörte. Es wurde zunächst der Meßwert des Kernes ermittelt, wovon ein sog. Leerwert des den Kern umgebenden Milieus subtrahiert wurde.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines programmierten Tischrechners (Programma Olivetti 101). Für die Fluoreszenzemissionen wurden Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung des Einzelwertes (s) und Standardabweichung des Mittelwertes ($s\bar{x}$) aus dem jeweiligen Beobachtungsmaterial berechnet und für Teilkollektive graphisch und tabellarisch dargestellt.

ERGEBNISSE

1. Ergebnisse nach der Acridinorange-Färbung

Die zytophotometrischen Ergebnisse nach der Acridinorange-Färbung, welche ein quantitatives Äquivalent für die sog. "freien DNA-PO₄-Gruppen" im Chromatin nativer Leberzellkerne der untersuchten Ratten darstellt, sind in den Tabellen I und II zusammengestellt. Tab. I enthält die mittleren Extinktionswerte mit Standardabweichungen und Standardabweichungen des Mittelwertes, gemessen an diploiden Interphase-Leberzellkernen aller Versuchs- und Kontrolltiere. Die mittleren Fluoreszenzemissionen der männlichen Kontrolltiere liegen bei Werten um 85 AE. Die mittleren Extinktionswerte der weiblichen Kontrolltiere bewegen sich zwischen 84 AE und 85 AE und zeigen somit keinen signifikanten Unterschied zu den männlichen Tieren. Auch konnte keine Abhängigkeit dieser Basisextinktionen der weiblichen, geschlechtsreifen Tiere von der Versuchsdauer aufgezeigt werden.

Die mittleren Fluoreszenzemissionen der männlichen Versuchstiere aus der Dosierungsgruppe I (1, 0 mg Östradiolbenzoat/die) bringen Werte um 95 AE. Die entsprechenden weiblichen Versuchstiere weisen mittlere Extinktionswerte um 95 AE auf, liegen damit auf dem gleichen Niveau wie die männlichen Tiere.

Unter einer Dosierung von 5, 0 mg Östradiolbenzoat/die ist ein deutlicher Anstieg der Farbstoffbindungskapazität des DNP für dieses Reagenz zu sehen, wobei die mittleren Fluoreszenzemissionen der männlichen Tiere sich bei 105 AE einpendeln. Die weiblichen Versuchstiere dieser Dosierungsgruppe bringen Werte zwischen 105 AE und 106 AE und zeigen somit keinen Unterschied zu denen der männlichen Tiere.

Die höchste Dosierungsgruppe mit 10, 0 mg Östradiolbenzoat/die führt ebenfalls zu keinen Unterschieden zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren. Die mittleren Fluoreszenzemissionen der männlichen Tiere betragen um 135 AE. Die mittlere Extinktion des einzig überlebenden weiblichen Versuchstieres (135 AE) deckt sich mit diesen Werten.

In Abb. 1 sind die zytophotometrischen Ergebnisse der Acridinorange-Färbung wiedergegeben. Die obere Hälfte der Abbildung demonstriert die mittlere Fluoreszenzemission des weiblichen Kontrollniveaus, das bei 84, 4 AE liegt und eine Standardabweichung von $\pm 1, 39$ AE aufweist, sowie die mittleren Extinktionen der weiblichen Versuchstiere aller drei Dosierungsgruppen. In der unteren Bildhälfte ist die mittlere Fluoreszenzemission des männlichen Kontrollniveaus, welches 84, 9 AE beträgt und eine Standardabweichung von $\pm 1, 1$ AE zeigt, dargestellt, sowie die mittleren Extinktionen der männlichen Versuchstiere der drei Dosierungsgruppen.

Tab. II bietet eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse nach der Acridinorange-Färbung. Hierzu wurden die Gruppenmittelwerte aus jeder Dosierungsgruppe und aus der Kontrollgruppe ermittelt. Die errechneten mittleren Fluoreszenzemissionen und ihre Standardabweichungen sind in Abb. 2 eingezeichnet. Der Gesamtmittelwert aus den mittleren Fluoreszenzemissionen diploider Rattenleberzellkerne beträgt für die Kontrollgruppe (Tiere Nr. 9, 10, 20, 21, 28, 29) $85, \pm 1, 31$ AE. Unter Hormonstimulierung mit 1, 0 mg Östadiolbenzoat/die steigt die Farbstoffbindungskapazität des DNP diploider Rattenleberzellkerne für AO auf $95, \pm 1, 13$ AE an. Bei einer täglichen intramuskulären Applikation von 5, 0 mg Östradiolbenzoat registriert man eine mittlere Fluoreszenzemission von $105, \pm 1, 04$ AE. Die Dosierungsgruppe III (10, 0 mg Östradiolbenzoat/die) erreicht mit einer mittleren Fluoreszenzemission von

$135 \pm 1,39$ AE die höchste Farbstoffbindungskapazität des DNP für dieses Reagenz.

Zusammenfassend findet man bei der Acridinorange-Färbung eine Proportionalität zwischen Hormondosierung und Anfärbbbarkeit sog. "freier DNA- PO_4 -Gruppen" im Chromatin diploider Rattenleberzellkerne dergestalt, daß einer steigenden Hormondosierung ebenfalls eine steigende Anfärbbbarkeit der sog. "freien DNA- PO_4 -Gruppen" parallel geht.

Tägl. Dosierung/ Tier (mg)	Tier-Nr	Geschlecht	$\bar{X}$ (AE)	S (AE)	$S\bar{X}$ (AE)
1	27	♀	95,47	1,26	0,09
	26	♀	95,45	1,27	0,09
	25	♀	95,35	1,06	0,08
	24	♂	95,36	1,10	0,08
	23	♂	95,37	0,99	0,07
	22	♂	95,26	1,08	0,08
5	19	♀	105,2	0,9	0,3
	18	♀	105,45	1,01	0,07
	17	♀	105,7	1,2	0,5
	16	♂	105,27	0,92	0,07
	15	♂	105,48	1,01	0,07
	14	♂	105,27	1,04	0,08
10	7	♀	134,9	1,3	0,1
	5	♂	134,5	1,4	0,2
	4	♂	135,16	1,05	0,07
	3	♂	134,8	1,7	0,2
Kontrollen	29	♀	84,6	1,8	0,2
	28	♂	85,03	1,28	0,09
	21	♀	84,46	0,96	0,07
	20	♂	84,95	0,97	0,07
	10	♀	84,2	1,3	0,2
	9	♂	84,6	1,1	0,2

Tab. I:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$) von Rattenleberzellkernen - gemessen in AE (1 AE = 2×10^{-3} μ A)

Färbung: Acridinorange

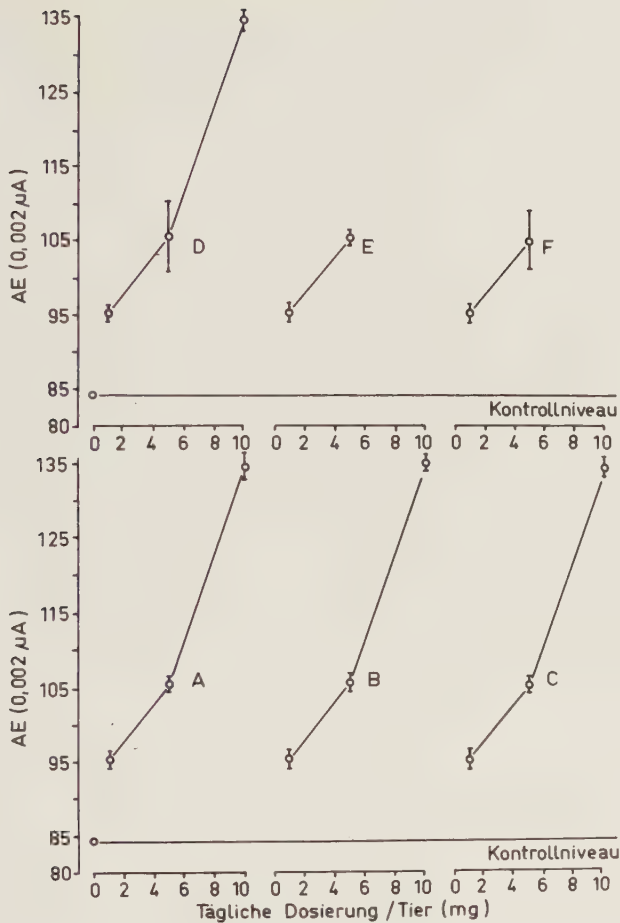


Abb. 1:

Mittlere Fluoreszenzemissionen- mit Standardabweichungen - von Rattenleberzellkernen in Abhängigkeit von der Hormondosierung.

Abszisse: Tägliche Dosierung Östradiolbenzoat/Tier (mg)

Ordinate: Fluoreszenzemissionen in AE (1 AE = 2×10^{-3} μ A)

Färbung: Acridinorange

Tägl. Dosierung/ Tier (mg)	$\bar{X}$ (A E)	S (A E)	$S\bar{X}$ (A E)
1	95,38	1,13	0,03
5	105,39	1,04	0,03
10	134,88	1,39	0,05
Kontrollen	84,65	1,31	0,04

Tab. II:

Gesamtmittelwerte der mittleren Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$) von
Rattenleberzellkernen je einer Dosierungsgruppe- gemessen in AE
(1 AE = 2×10^{-3} uA)

Färbung: Acridinorange

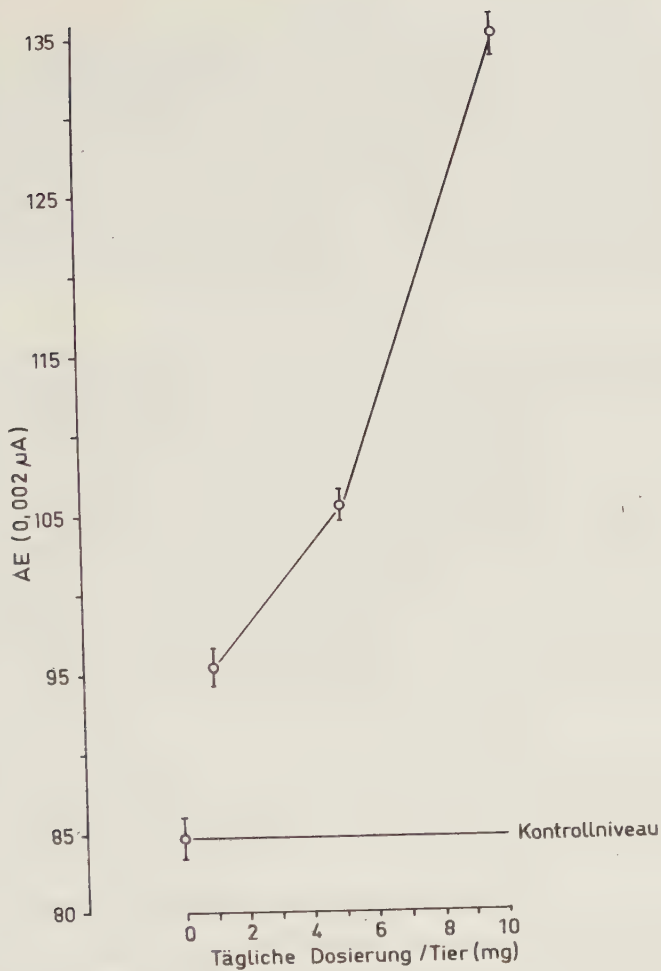


Abb. 2:

Mittlere Fluoreszenzemission - mit Standardabweichung - des für jede Dosierungsgruppe repräsentativen Mittelwertes aus den Leberzellkernen der untersuchten Tiere.

Abszisse: Tägliche Dosierung Östradiolbenzoat/Tier (mg)

Ordinate: Fluoreszenzemissionen in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \text{ uA}$)

Färbung: Acridinorange

2. Ergebnisse nach der Phenanthrenchinon-Färbung

Den Befunden der Acridinorange-Färbung wird der histo-chemische Nachweis der sog. arginireichen Histone zur Seite gestellt. Die Markierung dieser Histone gelingt mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon und erlaubt vermutlich eine quantitative Aussage über den Arginingehalt von Geweben. Dabei bilden sich zwischen dem Farbstoff und den Arginin-Guanidinogruppen relativ stabile Komplexe.

Tab. III vermittelt eine Übersicht über die mittleren Fluoreszenzemissionen und die Standardabweichungen der diploiden Leberzellkerne aller Versuchs- und Kontrolltiere. Man registriert, analog den Ergebnissen bei der Acridinorange-Färbung, mit steigender Hormondosierung eine deutliche Zunahme der Farbstoffbindungskapazität der sog. arginireichen Histone für das Phenanthrenchinon. Die mittleren Fluoreszenzemissionen der männlichen Kontrolltiere bewegen sich bei Werten zwischen 29 AE und 30 AE. Die mittleren Extinktionen der weiblichen Kontrolltiere decken sich mit diesen Werten.

Unter einer täglichen Hormonzufuhr von 1,0 mg Östradiolbenzoat lassen sich für die männlichen wie auch für die weiblichen Tiere mittlere Extinktionen um 42 AE erzielen.

Die mittlere Dosierungsgruppe (5,0 mg Östradiolbenzoat/die) weist einen weiteren Anstieg der Farbstoffbindungskapazität der Histone für dieses Reagenz auf. Die zytophotometrische Auswertung führte bei den männlichen Versuchstieren zu mittleren Meßwerten um 55 AE; bei den weiblichen Tieren ergab die Auswertung mittlere Extinktionen zwischen 55 AE und 56 AE, wobei zwischen männlichen und weiblichen Tieren wiederum keine signifikante Differenz nachweisbar ist.

Durch eine Steigerung der täglichen Hormonzufuhr auf 10,0 mg Östradiolbenzoat konnte man für die männlichen Versuchstiere mittlere Extinktionswerte zwischen 69 AE und 70 AE erreichen. Die mittlere Fluoreszenzemission für das einzige überlebende weibliche Versuchstier aus dieser Gruppe betrug 70 AE. Auch bei dieser Dosierungsgruppe ist kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren festzustellen.

In Abb. 3 sind die zytophotometrischen Ergebnisse der Phenanthrenchinon-Färbung dargestellt. Die obere Hälfte der Abbildung gibt die ermittelten Fluoreszenzemissionen aller weiblichen Versuchstiere sowie des weiblichen Kontrollniveaus wieder. Dieses Kontrollniveau, errechnet als Gruppenmittelwert aus den Tieren Nr. 10, 21 und 29, beträgt $29,6 \pm 1,4$ AE. Analog dazu sind in der unteren Bildhälfte die mittleren Extinktionen der männlichen Versuchstiere aller Dosierungsgruppen und des männlichen Kontrollniveaus aufgezeichnet. Für das männliche Kontrollniveau wurde ein Gruppenmittelwert bei $29,8 \pm 1,4$ AE registriert.

Eine zusammenfassende Übersicht über die zytophotometrischen Ergebnisse der PQ-Färbung ist in Tab. IV gegeben. Die errechneten Gruppenmittelwerte aus der Kontrollgruppe und aus den drei Dosierungsgruppen sind mit ihren Standardabweichungen in Abb. 4 aufgezeichnet. Es wurde hierzu nicht in männliche und weibliche Tiere getrennt, da diese sich ohnehin auf gleichem Niveau bewegen. Die mittlere Fluoreszenzemission der Kontrollgruppe beträgt $29 \pm 1,38$ AE. Die Hormonstimulation mit der niedrigsten Dosis von 1,0 mg Östradiolbenzoat/die läßt die mittlere Extinktion dieser Tiergruppe auf $42 \pm 1,59$ AE ansteigen. Unter Steigerung der täglichen Hormondosis auf 5,0 mg Östradiolbenzoat treten diploide Leberzellkerne mit einer mittleren Fluoreszenzemission von $55 \pm 1,22$ AE auf. Die höchste mittlere Extinktion mit einem Wert von

$70 \pm 1,36$ AE ist in der höchsten Dosierungsgruppe mit täglich 10,0 mg Östradiolbenzoat zu verzeichnen. Die in dieser Abbildung wiedergegebene Kurve zeichnet sich durch einen nahezu linearen Anstieg aus.

Tägl. Dosierung/ Tier (mg)	Tier-Nr.	Geschlecht	$\bar{X}$ (AE)	S (AE)	$S\bar{X}$ (AE)
1	27	♀	41,5	1,4	0,1
	26	♀	42,1	1,9	0,2
	25	♀	41,9	1,6	0,2
	24	♂	41,8	1,4	0,1
	23	♂	42,0	1,6	0,2
	22	♂	42,0	1,7	0,2
5	19	♀	55,45	1,10	0,08
	18	♀	55,61	1,00	0,07
	17	♀	55,42	1,21	0,09
	16	♂	55,45	1,11	0,08
	15	♂	55,3	1,4	0,1
	14	♂	55,3	1,4	0,1
10	7	♀	69,7	1,4	0,1
	5	♂	70,17	1,20	0,09
	4	♂	70,27	1,28	0,09
	3	♂	69,3	1,4	0,1
Kontrollen	29	♀	29,9	1,4	0,1
	28	♂	30,3	1,5	0,1
	21	♀	29,3	1,4	0,1
	20	♂	29,20	1,17	0,08
	10	♀	29,9	1,3	0,2
	9	♂	29,9	1,1	0,1

Tab. III:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{X}$) von Rattenleberzellkernen in Abhängigkeit von der Hormondosierung - gemessen in AE
(1 AE = 2×10^{-3} μ A)

Färbung: Phenanthrenchinon

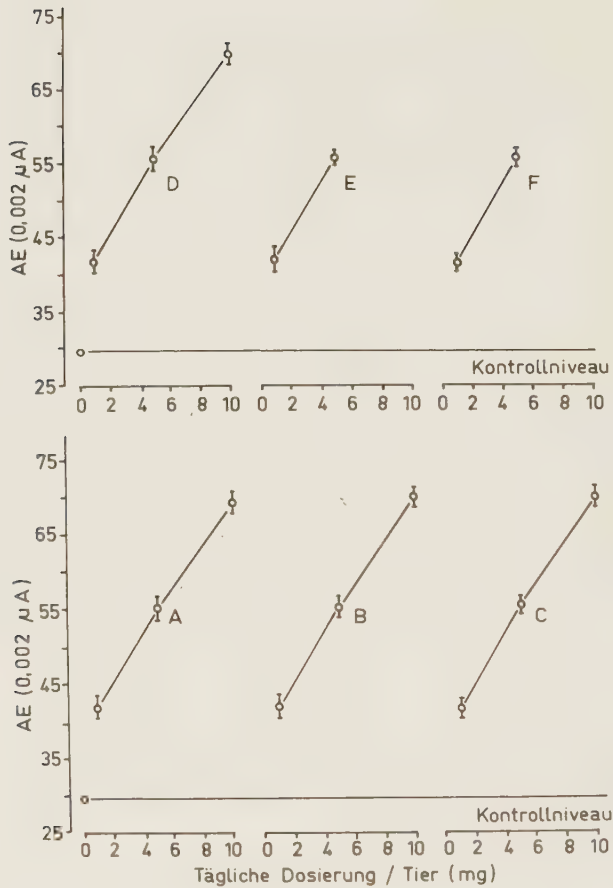


Abb. 3:

Mittlere Fluoreszenzemissionen - mit Standardabweichung - von Ratten-leberzellkernen in Abhängigkeit von der Hormondosierung

Abszisse: Tägliche Dosierung Östradiolbenzoat/Tier (mg)

Ordinate: Fluoreszenzemissionen in AE (1 AE = 2×10^{-3} μ A)

Färbung: Phenanthrenchinon

Tägl. Dosierung/ Tier(mg)	X (AE)	S (AE)	SX (AE)
1	41,86	1,59	0,05
5	55,42	1,22	0,04
10	69,87	1,36	0,05
Kontrollen	29,71	1,38	0,04

Tab. IV:

Gesamtmittelwerte der mittleren Fluoreszenzemissionen von Ratten-leberzellkernen je einer Tiergruppe - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} μ A)

Färbung: Phenanthrenchinon

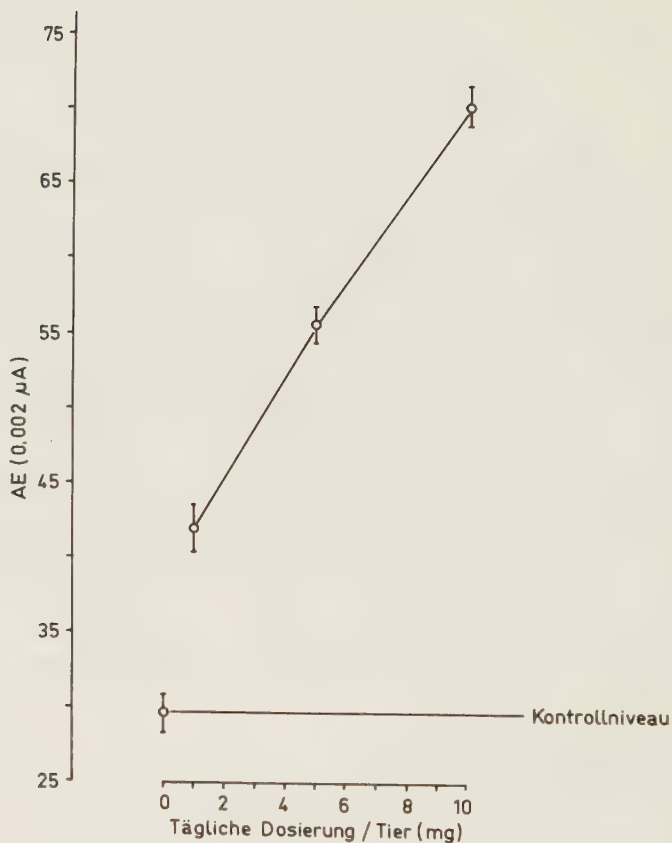


Abb. 4:

Mittlere Fluoreszenzemissionen - mit Standardabweichung - des für jede Tiergruppe repräsentativen Mittelwertes der Leberzellen der untersuchten Tiere

Abszisse: Tägliche Dosierung Östradiolbenzoat/Tier (mg).

Ordinate: Fluoreszenzemissionen in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$)

Färbung: Phenanthrenchinon

3. Ergebnisse nach der Feulgen-Nukleal-Reaktion

Um eine Aussage über quantitative Veränderungen der DNA treffen zu können, wurde die Feulgen-Färbung angeschlossen, welche die quantitative Erfassung der intranukleären DNA ermöglicht. Die zytophotometrischen Ergebnisse der Feulgen-Nukleal-Reaktion sind in Tab. V zusammengestellt. Als Referenzsystem dienen die in jedem Präparat zahlreich vorhandenen Lymphozyten. Ihre mittleren Fluoreszenzemissionen, Standardabweichungen und die Standardabweichungen des Mittelwertes sind in Klammern angegeben. Für die Durchführung der Feulgen-Nukleal-Reaktion wurden aus der Kontrollgruppe die Tiere 9 (männlich) und 10 (weiblich) gewählt, aus der Dosisgruppe III (10, 0 mg Östradiolbenzoat/die) die Tiere 3 (männlich) und 7 (weiblich). Für die diploiden Leberzellkerne der Kontrolltiere registrierte man mittlere Fluoreszenzemissionen von $14,6 \pm 1,5$ AE und $15,1 \pm 1,5$ AE. Die mittleren Extinktionen der diploiden Leberzellkerne der Versuchstiere weisen mit $15,3 \pm 1,0$ AE und $15,4 \pm 1,3$ AE keinen Unterschied zu den Kontrolltieren auf.

Die mittleren Fluoreszenzemissionen der homologen Lymphozyten aus der Kontrollgruppe betragen $14,8 \pm 1,2$ AE und bleiben unter Stimulierung mit 10, 0 mg Östradiolbenzoat/die mit $15,2 \pm 1,0$ AE konstant. Auch zwischen den mittleren Extinktionen von Leberzellkernen und Lymphozyten ist keine Differenz festzustellen. Diese Ergebnisse berechtigen zu der Aussage, daß unter höchster Hormonstimulation in diploiden Interphase-Rattenleberzellkernen der DNA-Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Tieren konstant bleibt.

Abb. 5 spiegelt die in Tab. V. angegebenen Werte in Form von Säulendiagrammen wieder.

Tägl. Dosierung/ Tier (mg)	Tier-Nr.	Geschlecht	$\bar{X}$ (A E)	S (A E)	$S\bar{X}$ (A E)
10	7	♀	15,4	1,3	0,2
	3	♂	15,3 (15,2)	1,0 (1,0)	0,2 (0,2)
Kontrollen	10	♀	15,1	1,5	0,3
	9	♂	14,6 (14,8)	1,5 (1,2)	0,3 (0,2)

Tab. V:

Mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$) von Rattenleberzellkernen und Lymphozyten (Werte in Klammern) - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} uA)

Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

AE ($2 \times 10^{-3} \mu A$)

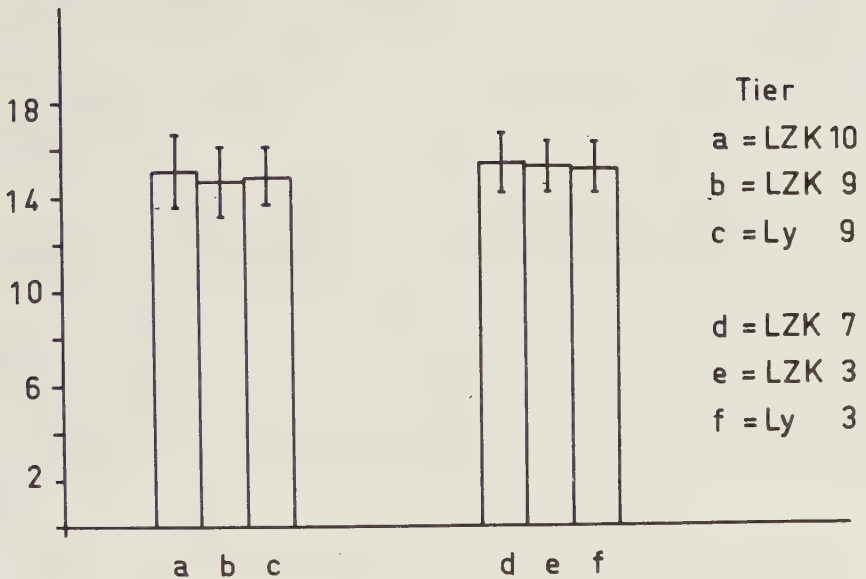


Abb. 5:

Mittelwerte der Fluoreszenzemissionen diploider Rattenleberzellkerne (LZK) und homologer Lymphozyten (Ly) mit Standardabweichungen des Mittelwertes.

Tiere 9 und 10: Kontrolltiere

Tiere 3 und 7: 10 mg Östradiolbenzoat/die

Abszisse: Tägliche Dosierung Östradiolbenzoat/Tier (mg)

Ordinate: Fluoreszenzemissionen in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu A$)

Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

4. Ergebnisse nach der Fastgreen-FCF-Färbung

In Tab. VI sind die zytophotometrischen Ergebnisse der Fastgreen-FCF-Färbung wiedergegeben. Diese Färbemethode erlaubt eine selektive Anfärbung der nukleären basischen Histone. Hierzu wurden Leberzellkerne und homologe Lymphozyten der Tiere 9 und 10 (Kontrollgruppe) sowie der Tiere 5 und 7 (10, 0 mg Östradiolbenzoat/die) mit Fastgreen-FCF angefärbt. Die Auswertung ergab mittlere Meßwerte von $12,9 \pm 0,9$ AE für das männliche, und $13,3 \pm 0,8$ AE für das weibliche Kontrolltier. Unter einer täglichen Hormonapplikation von 10, 0 mg Östradiolbenzoat ist kein Anstieg der mittleren Fluoreszenzemissionen zu verzeichnen. Das weibliche Versuchstier erreichte eine mittlere Extinktion von $13 \pm 1,3$ AE; das männliche Versuchstier erzielte eine mittlere Fluoreszenzemission von $13 \pm 0,9$ AE. Auch an den homologen Lymphozyten ist hinsichtlich der mittleren Extinktionen kein Unterschied zwischen dem Kontrolltier ($13 \pm 0,8$ AE) und dem Versuchstier ($13 \pm 1,0$ AE) festzustellen. Die mittleren Extinktionen der homologen Lymphozyten des Versuchs- wie auch des Kontrolltieres zeigen keinen Unterschied zu den mittleren Fluoreszenzemissionen der Leberzellkerne, weder zu denen der Kontroll-, noch zu denen der Versuchstiere. Daraus ist zu schließen, daß unter Hormonstimulation der Gehalt an basischen nukleären Histonen konstant bleibt.

Abb. 6 demonstriert die mittleren Extinktionen von Leberzellkernen und homologen Lymphozyten bei Kontroll- und Versuchstieren, dargestellt in Form von Säulendiagrammen.

5. Änderungen des Körpergewichtes unter Hormoneinfluß

Während die männlichen und weiblichen Kontrolltiere ihr Körpergewicht während der Versuchsdauer halten oder steigern, fällt bei den Tieren aller Dosierungsgruppen ein leichter Abfall des Körpergewichtes auf (Tab. VII).

Tägl. Dosierung/ Tier (mg)	Tier-Nr.	Geschlecht	$\bar{X}$ (A E)	S (A E)	$S\bar{X}$ (A E)
10	7	♀	13,6 (13,1)	1,3 (1,0)	0,2 (0,2)
	5	♂	13,1	0,9	0,2
Kontrollen	10	♀	13,3 (12,9)	0,8 (0,8)	0,2 (0,2)
	9	♂	12,9	0,9	0,2

Tab. VI:

Mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$) von Rattenleberzellkernen und Lymphozyten (Werte in Klammern) - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} uA)

Färbung: Fastgreen-FCF-Färbung

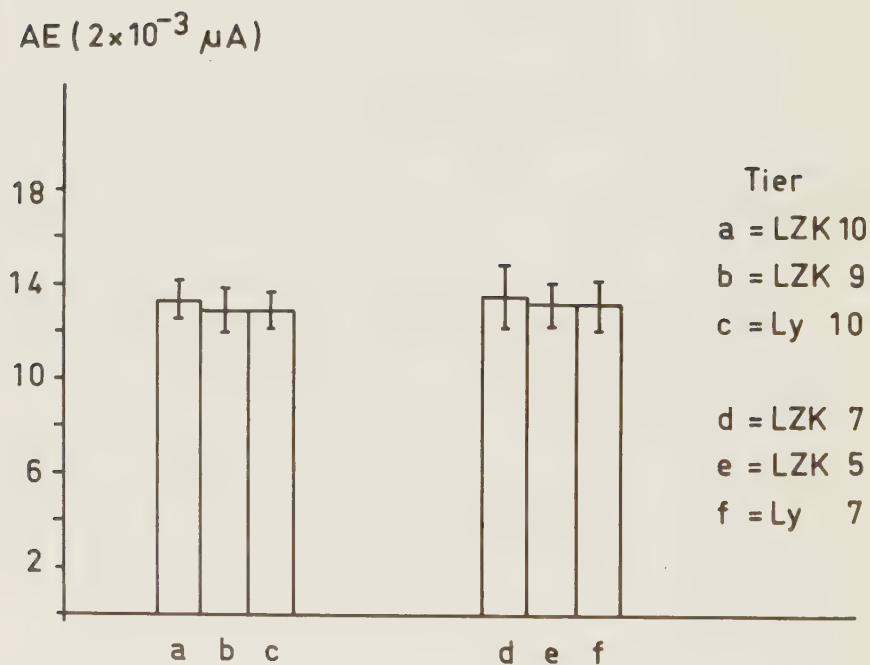


Abb. 6:

Mittelwerte der Fluoreszenzemissionen diploider Rattenleberzellkerne (LZK) und homologer Lymphozyten (Ly) mit Standardabweichungen des Mittelwertes

Tiere 9 und 10: Kontrolltiere

Tiere 5 und 7: 10 mg Östradiolbenzoat/die

Abzisse: Tägliche Dosierung Östradiolbenzoat/Tier (mg)

Ordinate: Fluoreszenzemissionen in AE (1 AE = $2 \times 10^{-3} \mu A$)

Färbung: Fastgreen-FCF-Färbung

Tägl. Dosierung Östradiolbenzoat/ Tier (mg)	Tier-Nr.	Geschlecht	K ö r p e r g e w i c h t (g)		Lebergewicht (g)
			Versuchsbeginn	Versuchsende	
1	27	♀	250	240	8
	26	♀	270	240	8
	25	♀	260	230	8
	24	♂	370	340	11
	23	♂	350	340	11
	22	♂	345	315	12
5	19	♀	290	260	9
	18	♀	280	260	11
	17	♀	290	265	10
	16	♂	360	350	14
	15	♂	355	315	10
	14	♂	355	335	12
10	7	♀	280	260	9
	5	♂	340	320	13
	4	♂	310	290	13
	3	♂	360	320	12
Kontrollen	29	♀	255	255	8
	28	♂	385	390	12
	21	♀	270	260	7
	20	♂	390	405	13
	10	♀	250	260	9
	9	♂	305	310	11

Tab. VII:

Körper- und Lebergewichte männlicher und weiblicher Ratten unter 6-tägiger intramuskulärer Applikation von Östradiolbenzoat in 3 Dosierungen

DISKUSSION

Nachdem das Östradiolbenzoat durch intramuskuläre Applikation in den Organismus und, an Plasmaproteine gebunden, bis an die Zelle des Erfolgsorgans gelangt ist, bedarf es zur hormonellen Einflußnahme auf die Funktionsstrukturen des Zellkerns eines transmembranösen Hormontransportes an des Kernchromatin. Über den genauen Transportmechanismus durch die zytoplasmatische und die nukleären Membranen ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise kommt ein passiver Diffusionsmechanismus in Frage, wie RENNIE und BRUCHOVSKY (1973) am Transport von Androgen und Östrogen in die Prostata der Ratte nachweisen konnten. Demzufolge stellt der Steroid-Rezeptorkomplex einen Carrier-Substratkomplex dar, der auf der einen Seite der Membran gebildet und dann auf der anderen Seite so verändert wird, daß der Carrier seine Substratspezifität verringert. BILLING et al (1969 a) und KÜHNNAU (1971) diskutierten die Bindung des Östrogens an das Membran-gebundene Cyclo-AMP-System, das unter Hormoneinfluß die Membranpermeabilität verändert.

Nach Durchtritt durch die zytoplasmatische Membran wird das Östrogen von einer makromolekularen Substanz unter Bildung eines Hormon-Rezeptorkomplexes aufgenommen. Dieser Rezeptor hat Proteincharakter und weist einen Sedimentationskoeffizienten von 9 S auf. Im Rattenuterus ist der 9 S-Rezeptor-Hormonkomplex nur extranukleär gelegen (JENSEN et al, 1968). Bei der Hormonaufnahme in den Zellkern verringert sich die Aktivität des 9 S-Rezeptor-Hormonkomplexes in dem Maße, in dem ein intranukleär gelegener 5 S-Rezeptor-Hormonkomplex auftritt. Nach HARRIS (1971) reagiert der Nagetieruterus auf die Zufuhr von Östradiol-17 β mit der Bildung eines spezifischen Rezeptormoleküls von 8 S, ohne daß eine chemische Transformation des Steroides stattfindet. Es bildet sich ein Rezeptor-Hormonkomplex, der das Hormon

dann in Form eines 4-5 S-Rezeptor-Hormonkomplexes in den Zellkern schleust. In vitro und in vivo Versuche (CLARK und GORSKI, 1969; HARRIS, 1971) ließen in dem Hormontransport einen temperaturabhängigen Vorgang erkennen, der nicht zuletzt auch an die Ionenstärke des umgebenden Mediums gebunden ist (VONDERHAAR et al, 1970). Ähnliches konnten GARDNER und WITLIF (1973) an der laktierenden Rattenmammary beobachten. MUSLINER und CHADER (1972) erzielten durch Erhöhung der Substratkonzentration eine Dissoziation des 8 S-Rezeptors in zwei kleinere Untereinheiten, von denen nur die 4 S-Einheit, die identisch mit dem intranukleären Rezeptor ist, zur Östrogenbindung fähig scheint. Für die Bindungsfähigkeit des nukleären Rezeptors wurde im zellfreien System von Rattenuteruszellen eine deutliche Temperatursensibilität nachgewiesen (WILLIAMS und GORSKI, 1973).

Das Auftreten eines zytoplasmatischen sowie eines nukleären Rezeptors mit unterschiedlichen Sedimentationskonstanten trifft für Uteruszellen von Ratten und Kaninchen zu, während Östradiol im Uterus von Menschen und Affen sowohl extra- als auch intranukleär an einen 5 S-Rezeptor gebunden wird (WYSS et al, 1968). Seiner chemischen Natur nach ist das Rezeptor-Protein als ein Nicht-Histon-Protein anzusehen (KING et al, 1969; GSCHWENDT und KITTSTEIN, 1974). O' MALLEY et al (1972) wie auch SPELSBERG et al (1972) definierten die sauren Proteine des Chromatins als Steroidakzeptoren. An Kalbsuteruszellen demonstrieren PUCA et al (1972) die Umwandlung des zytoplasmatischen 8, 6 S-Hormonrezeptors in das nukleäre 4, 5 S-Rezeptorprotein. Diese Umwandlung ist an die Anwesenheit eines durch Ca^{2+} aktivierten, selbständigen Eiweißfaktors, des sog. RT-Faktors (Receptor Transforming Factor) gebunden.

STANCEL et al (1973 a, b) konnten beweisen, daß diese unterschiedlichen Aussagen über die Sedimentationskonstanten von zytoplasmati-

schen und nukleären Rezeptorproteinen im Rattenuterus auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen sind. In Pufferlösungen ohne Salzzusatz variiert der Sedimentationskoeffizient zwischen 7 S und 9 S. In 0,15 mKCl finden sich Werte zwischen 3,8 S und 7 S, und in 0,4 mKCl entdeckt man Schwankungsbreiten von 3,8 S bis 4,8 S. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen die Untersuchungen von ARIAS und WARREN (1971), denen der Nachweis nur eines Rezeptorproteins von 4 S im Hühnerleberzytosol gelang. MESTER und BAULIEU (1972) sprechen nur von einem intranukleär gelegenen Östrogenrezeptor in der Hühnerleber. Bei Zellzerstörung wird dieser nukleäre Hormonrezeptor möglicherweise freigesetzt und imponiert dann, wie in den Ergebnissen von ARIAS und WARREN (1971) geschildert, als zytoplasmatischer Rezeptor.

Die Rattenleber unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Steroidbindungsstellen nicht wesentlich von der Hühnerleber. ROY et al (1974) isolierten aus der Rattenleber ein 3,5 S-Protein mit hoher Affinität zu Östrogenen und Androgenen. Andere Steroide besitzen wahrscheinlich in der Leber von Ratten ein strukturell und biochemisch ähnliches nukleäres Rezeptorprotein, wie aus den Arbeiten von GOPALAKRISHNAN und SADGOPAL (1972) hervorgeht. Diese definierten den Rezeptor für das Steroidhormon Cortisol in der Rattenleber als eine Nicht-Histon-Komponente mit 3,7 S. Ähnlich konnten BEATO et al (1973) an Rattenleberzellkernen unter Dexamethasonzufuhr eine Steigerung der nukleären Hormonbindungsstellen unter gleichzeitiger Bildung eines Steroid-Proteinkomplexes von 4 S nachweisen. In diesen Fällen verändert die Bindung des Hormons an den Rezeptor wahrscheinlich dessen Konfiguration derart, daß dieser leichter mit den Akzeptorstellen im Chromatin reagieren kann.

Die Östrogenwirkung am Rattenuterus findet ihren Ausdruck in einer gesteigerten uterinen RNA-Synthese (BILLING et al, 1969 a, b; EPIFANOVA,

1966; HAMILTON, 1963; HAMILTON et al, 1968 b). Auch an der Hühnerleber beobachteten COOLSMAN und GRUBER (1968) eine Östradiol-induzierte RNA-de-novo-Biosynthese. Im Anschluß an diese RNA-Synthese ist die Synthese eines für die Geflügelleber spezifischen Proteins, des Phosvitins, zu verzeichnen (GREENGARD et al, 1964, 1965). Die Phosvitinsynthese kann einmal über eine Zunahme der Serin-Aufnahme in die Leber-tRNA zustande kommen (GROVER et al, 1972; KLYDE und BERNFIELD, 1973), zum anderen aber über eine Duplikation begrenzter genetischer Bezirke (JAILKHANI und TALWAR, 1972). Ein dem Phosvitin analoges Protein, das Lipovitellin, wird in der Amphibienleber nach Östrogenapplikation gebildet und anschließend ins Serum abgegeben (WALLACE und JARED, 1968, 1969; WITLIFF und KENNEY, 1969, 1972; WITLIFF et al, 1972).

Auch der Fettstoffwechsel erfährt unter Hormonzufuhr eine Veränderung dahingehend, daß durch Östrogeneinfluß der Serumspiegel von Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden bei der Ratte deutlich erhöht wird (HILL und DVORNIK, 1969). Die Freisetzung von Triglyceriden in der Rattenleber wird durch weibliche Sexualhormone stimuliert (WEINSTEIN et al, 1974). Unter dem Einfluß dieser Hormone wird in der Rattenleber weiterhin die Aktivitätssteigerung bestimmter Enzymsysteme gefördert. Außerdem gelang es BRAIDMAN und ROSE (1971), den fördernden Einfluß von Östradiolbenzoat auf die Synthese der Tryptophan-Oxygenase, der Tyrosin-Aminotransferase und der Alanin-Aminotransferase in der Leber weiblicher Ratten nachzuweisen. GUSTAFSSON und INGELMAN-SUNDBERG (1974) erreichten durch Östradiolzufuhr bei erwachsenen männlichen und weiblichen Ratten eine deutliche Aktivitätssteigerung des 15 β -Hydroxylase-Systems der Lebermikrosomen.

Diese Ergebnisse beruhen auf einer hormoninduzierten Protein-de-novo-Biosynthese, die ihren Ausgang von einer gesteigerten intranukleären

RNA-Synthese in Leber und Uterus nimmt (KARLSON und SEKERIS, 1973; WICKS et al, 1965; CHURCH und MC CARTHY, 1970). HAMILTON (1968) wies eine substantielle Bindung des Östrogens an das Kernchromatin nach. Diese zieht eine gesteigerte mRNA-Bildung mit Akkumulation neuer Polysomen im Zytoplasma nach sich. Intranukleäre Reaktionen und RNA-Synthese sind als die Startereignisse der frühen Östrogenauswirkungen anzusehen (HAMILTON, 1963). Eine hormoninduzierte RNA-de-novo-Biosynthese ist daher nicht nur am Rattenuterus zu beobachten (MUELLER et al, 1961; HAMILTON et al, 1968 a, b; BILLING et al, 1969 b), sondern sie ist ebenso in den Lebern von Hühnern (COOLSMA und GRUBER, 1968) und von Ratten (LÖHR, 1972; 1973) von Bedeutung. Zur Erklärung der hormonstimulierten Mehrbildung intranukleärer RNA bieten sich mehrere Möglichkeiten an:

Es darf als gesichert gelten, daß unter Östrogeneinfluß eine gesteigerte RNA-Polymeraseaktivität auftritt. Hinsichtlich des Typs der unter Hormonstimulierung primär aktivierten RNA-Polymerase spiegeln die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Autoren unterschiedliche Meinungen wieder. HAMILTON et al (1965, 1968 a) sowie LUCK und HAMILTON (1972) erzielten durch Östradiolgabe am Rattenuterus primär einen Aktivitätsanstieg der rRNA-Polymerase, erst im Anschluß daran wurde die mRNA-Polymerase aktiviert. GREENMAN et al (1965) wiesen als Steroideffekt an Leberzellen den Einbau von ^{32}P in RNA-Komponenten nach, die nukleäre Vorstufen sowohl der m- als auch der rRNA darstellen. GLASSER et al (1972) gelang es, nach Östrogenzufuhr im Rattenuterus als erstes die Aktivität der mRNA-Polymerase zu steigern, dann erst die der rRNA-Polymerase. Da die mRNA-Polymerase Voraussetzung ist für die Synthese der mRNA, und da ebenso die rRNA nur in Anwesenheit von rRNA-Polymerase synthetisiert werden kann, so berechnen die Untersuchungsergebnisse von GLASSER et al (1972) wie auch die von HAMILTON (1968) sowie DATI und MAURER (1971) zu

der Aussage, daß das Steroidhormon Östradiol die Matrizentätigkeit des Chromatins erhöht und seine Wirkung somit auf der Ebene der Transkription ausübt. Der fördernde Einfluß des Östrogens auf die Transkription der RNA ist ebenfalls für die Hühnerleber beschrieben (HAHN et al, 1969). Am Eileiter noch nicht geschlechtsreifer Hühner äußert sich der Hormoneinfluß in einem Synthesenanstieg von vier, für die Bildung spezifischer Proteine verantwortlichen mRNA-Formen (PALMITER, 1972). Ein weiterer Ausdruck für die durch das Steroidhormon Östradiol bewirkte Änderung der Matritzenaktivität des Chromatins ist möglicherweise in der hormoninduzierten de-novo-Biosynthese des Enzyms RNA-Methylase in der Rattenleber zu sehen (SHIED et al, 1970).

Dementsprechend beobachtet man unter Östrogenstimulation eine gesteigerte Aufnahme radioaktiv markierter Vorläufer in die RNA (BILLING et al, 1969a). An ovariectomierten und anschließend mit Östron behandelten Ratten ließ sich ein beschleunigter Einbau von Guanin und Uracil in die uterine RNA nachweisen (SESHADRI und WARREN, 1969). Durch in vivo Versuche vermochten die gleichen Autoren eine durch Östrogenapplikation gesteigerte Matritzenaktivität des uterinen Chromatins mit vermehrtem Einbau von Nukleotidtriphosphaten in die RNA zu demonstrieren.

Neuere Untersuchungen lassen als Wirkungsort des Östrogens speziell die Ribosomen vermuten. So konnten MÜLLER et al (1974 c) primär den Anstieg der RNA-Polymerase I (rRNA-Polymerase) in den Eileitern östrogenbehandelter japanischer Wachteln nachweisen. Dieses Enzym ließ sich mit den Methoden der Chromatographie, der Gelfiltration und der Saccharose-Diffusion nicht von einem ebenfalls zur Gruppe der sauren Kernproteine zählenden Östrogen-Rezeptor trennen. Entweder formen das Östrogen-bindende Protein und die RNA-Polymerase I einen

Komplex, oder aber beide haben eine sehr große Affinität zum Chromatin. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen auf einen möglichen Einfluß des östrogen-bindenden Proteins auf die Transkriptionsrate hormonstimulierter Eileiterzellen. Ebenfalls an den Eileiterzellen unreifer japanischer Wachteln demonstrierten MÜLLER et al (1974 b) die nach Östrogenapplikation gesteigerte Transkriptionsrate der DNA.

Nach TALWAR et al (1964) und SEGAL et al (1965) dagegen kommt die durch Östrogen hervorgerufene Steigerung der Transkriptionsrate uteriner DNA nur dann zustande, wenn die DNA-abhängige Polymerase ihre Aktivität frei entfalten kann. Das Hormon Östrogen besitzt in der makromolekularen Gewebsfraktion der Uteruszellen spezifische Rezeptoren. In Abwesenheit des Hormons blockiert ein in der gleichen Fraktion vorkommender Repressor die Transkription der genetischen Information und hält das hormonsensible Gewebe in atrophischem Zustand. Eine Hormonaufnahme über den Rezeptor hebt die Repression der RNA-Synthese auf. Somit wirkt das Östradiol als Derepressor der uterinen DNA.

Die Erkenntnis, daß das Östrogen als Derepressor der genetischen Aktivität der DNA fungiert, ist als bedeutender Punkt für das Verständnis hormoneller Einflußnahme auf Stoffwechselvorgänge zu werten. Eine Schlüsselfunktion bei der Derepression der zur Weitergabe des gespeicherten Informationsmaterials befähigten DNA-Anteile kommt den Histonen zu.

Diese nukleären basischen Proteine sind in ihrer Mehrzahl im Chromatin lokalisiert (BUSCH, 1965). Im Interphase-Zellkern sind sie vermutlich in der Weise an die DNA gebunden, daß ihre Guanidinogruppen oder ihre NH_2 -Residuen die Phosphatgruppen der DNA zu neutralisieren vermögen. Das Verhältnis von basischen Aminosäuren zu Phosphatgruppen beträgt nahezu 1. Für die meisten Zellen sind fünf Hauptgruppen der

Histone bekannt (SHIH und FASMAN, 1972; BUCKINGHAM und STOCKEN, 1970), und zwar die Fraktionen F_1 , F_{2a1} , F_{2a2} , F_{2b} und F_3 , wobei die Histongruppen F_1 und F_{2b} als lysinreich bezeichnet werden, die Fraktionen F_{2a1} und F_3 hingegen zu den argininreichen Histonen zählen (RUSSEV et al, 1974). Genauer erforscht sind die Bindungen zwischen den F_{2a1} -Histonen und der DNA (ZICCARDI und SCHUMAKER, 1973). Hier liegt ein dachziegelartiger Bindungsmechanismus vor, bei dem die hydrophobische Hälfte eines Histons die basische Hälfte des vorhergehenden Moleküls bedeckt, während sich die Histone dabei um die DNA-Helix herum anordnen. Die Bindung der einzelnen Histonfraktionen an die DNA ist unterschiedlich stark; die Bindung zwischen den argininreichen Histonen und der DNA ist stabiler als die Bindung zwischen den lysinreichen Histonen und der DNA.

Die Funktion der Histone besteht möglicherweise in einer unspezifischen Repression der DNA, indem die genetisch aktiven DNA-PO_4^- -Gruppen durch die Guanidinogruppen neutralisiert werden. Hinsichtlich der Fähigkeit, die DNA an der Ausübung ihrer Matrizenfunktion zu hindern, sind die argininreichen Histone wirksamer als die lysinreichen Histone. Die hemmende Funktion kommt zum einen über eine Inaktivierung der RNA-Polymerase durch die Histone zustande (SPELSBERG et al, 1969; SPELSBERG und HNILICA, 1969 a), sodaß die Transkription der DNA verhindert wird. Zum andern werden die Histone als Genrepressoren über eine direkte Maskierung der DNA im Chromatin wirksam (PAUL und GILMOUR, 1968). Durch in vitro und in vivo Versuche konnte bewiesen werden, daß nach Histongabe eine zuvor vorhanden gewesene Matrizenaktivität der DNA blockiert wurde (JOHNS, 1972; HOARE und JOHNS, 1971; SLUYSER et al, 1965).

Nach BUSCH (1965) wird durch Strukturveränderungen an den Histonen ihr inhibitorischer Effekt auf die Matrizenfunktion des Chromatins verringert. Diese sind möglich auf dem Wege der Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung (GALLWITZ und SEKERIS, 1969; GALLWITZ, 1971; LANGAN und SMITH, 1967). KÜHNAU (1971) bezeichnet Hormone als Signalgeber biologischer Regelsysteme, welche über die Synthese bestimmter Proteinkinasen unter anderem eine Phosphorylierung der die DNA blockierenden Histone bewirken, und so über eine Enthemmung der DNA die maximale Expression des gespeicherten Informationsmaterials auf dem Niveau der RNA garantieren. Der Einfluß des Steroidhormones Östrogen auf die Acetylierung der argininreichen Histone ist am Beispiel des Rattenuterus vielfach in der Literatur bewiesen (LIBBY, 1971, 1972; ANDERSON und GORSKI, 1971). Für die Säugetierleber steht der Nachweis eines derartigen Wirkungsmechanismus jedoch noch aus.

Die dargelegten Ergebnisse erlauben den Schluß, daß das Steroidhormon Östradiol seinen Einfluß auf die Funktionsstrukturen des Zellkerns auf der Ebene der Transkription ausübt. Auf welche Weise die Struktur der DNA durch den hormonellen Einfluß gewandelt wird, ist nicht genau bekannt. Anhand der in der Literatur nachgewiesenen Histonveränderungen erscheint die Acetylierung der argininreichen Histone und die damit verbundene Demaskierung der DNA für die Transkription der DNA von entscheidender Bedeutung. Die in der vorliegenden Untersuchung angewandten zytochemischen Reaktionen - Acridinorange-Färbung, Phenanthrenchinon-Färbung, Feulgen-Nukleal-Reaktion und Fastgreen-FCF-Färbung - eignen sich durch Erfüllung der eingangs erwähnten Voraussetzungen für eine zytophotometrische Untersuchung der Reaktionspartner DNA und Histone im Chromatin von Rattenleberzellkernen.

Der basische Farbstoff Acridinorange bindet sich spezifisch an Nukleinsäuren in Abhängigkeit von ihrer Sekundärstruktur (RIGLER, 1966). Bei hochstrukturierten Nukleinsäuren wird ein AO-Molekül von 3 Nukleinsäure-Basenpaaren gebunden. Mit abnehmendem Ordnungsprinzip der Nukleinsäurekette nimmt die Farbstoffbindungskapazität für das AO zu. Die Anlagerung des AO an die Nukleinsäuren im intakten Nukleoprotein wird durch die Aminogruppen der konkomittanten Proteine beeinflusst. Der Einfluß dieser Aminogruppen wird bei der Färbung durch Zusatz von Essigsäureanhydrid ausgeschaltet, so daß die freien Farbstoffbindungsgruppen, die sog. "freien DNA- PO_4 -Gruppen", an der Nukleinsäure bestimmt werden können. Die Farbstoffbindungskapazität des DNP für das Acridinorange wird durch die Matrizenaktivität der im Chromatin verankerten DNA bestimmt. Eine zunehmende genetische Aktivität ist verbunden mit einer Zunahme in der Freisetzung farbstoffbindender DNA- PO_4 -Gruppen des DNP. Diese Reaktion zeigt dann vermutlich eine partielle oder vollständige Dissoziation des DNP-Komplexes in DNA und Histone an.

RIGLER et al (1969) wiesen nach, daß einer in vitro mit PHA stimulierten RNA-Synthese an menschlichen Erythrozyten eine gesteigerte Bindung des Farbstoffes Acridinorange vorausgeht. Diese gesteigerte Farbstoffbindungskapazität ist auf eine Demaskierung der Farbstoffbindungsstellen im DNP zurückzuführen. KILLANDER und RIGLER (1969) gelang es, durch PHA-Stimulation an menschlichen Leukozyten die AO-Farbstoffbindungskapazität zu steigern als Ausdruck einer geschwächten Wechselwirkung zwischen DNA- PO_4 -Gruppen und den basischen Aminosäuren der Histone. Das Ausmaß, in welchem sich AO an die DNA bindet, variiert also mit dem jeweils aktuellen funktionellen Zustand des nukleären Chromatins. Eine hohe Farbstoffbindungskapazität ist assoziiert mit aktiven, RNA synthetisierenden Zellkernen; eine niedrige Farbstoffbindungskapazität zeigt ein inaktives, kondensiertes Kernchromatin an (RINGRTZ et al, 1970).

Die AO-Reaktion ist umstritten. So stellen LING und KAY (1975) alle bisher erbrachten Beweise für eine unter PHA-Stimulation auftretende Dissoziation des DNP in DNA- PO_4 -Gruppen und Histone in Frage. Es sollen zwar, wie DARZYNKIEWICZ et al (1969 b) beschrieben, PHA-stimulierte und bei 4 Grad Celsius inkubierte Lymphozyten einen Anstieg der Farbstoffbindungskapazität für AO aufweisen, jedoch werden nach Meinung von LING und KAY (1975) bei einer Temperatur von 4 Grad Celsius enzymatische Prozesse wie die Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung argininreicher Histone blockiert. Die Autoren sehen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der unter Stimulation auftretenden Phosphorylierung und Acetylierung von Histonen und einer gleichzeitig beachteten Proteinsynthese. Allerdings besteht ein Zusammenhang zwischen den an regenerierenden Zellen beobachteten Histonveränderungen (BALHORN et al, 1972; POGO et al, 1968) und der DNA-Synthese. Trotzdem steht nach Meinung von LING und KAY (1975) eine Assoziation zwischen Histonacetylierung und / oder -phosphorylierung zur Diskussion.

Unsere zytophotometrischen Meßwerte der Acridinorange-Färbung stehen jedoch in gutem Einklang mit den Untersuchungsergebnissen von RIGLER (1966), KILLANDER und RIGLER (1969), RINGERTZ et al (1970 b), DARZYNKIEWICZ et al (1969 b) und LÖHR (1972, 1973). LÖHR et al (1974 a, b, c) und MÜLLER et al (1974 a) konnten den Nachweis einer strengen zeitlichen Korrelation zwischen dem Anstieg der Farbstoffbindungskapazität des DNP diploider Interphase-Rattenleberzellkerne für das AO mit einer signifikant erhöhten Polysomen-de-novo-Kondensation am Modell der hormoninduzierten RNA-de-novo-Biosynthese erbringen. Ihre Untersuchungen führen zu dem Schluß, daß mit dem Anstieg der hormoninduzierten mRNA-de-novo-Biosynthese eine Freisetzung von DNA- PO_4 -Gruppen verbunden ist.

Wie die dargelegten Meßwerte demonstrieren, geht einer steigenden Dosierung mit Östradiolbenzoat ein fast linearer Anstieg in der Farbstoffbindungskapazität sog. "freier DNA-PO₄-Gruppen" für den basischen Farbstoff Acridinorange parallel. Diese Ergebnisse erlauben die Folgerung, daß unter der Hormonstimulation eine Erhöhung der Matrizenaktivität der DNA für die Transkription von RNA verschiedener Fraktionen eintritt. Um eine Erhöhung der Genaktivität mit Steigerung der Transkriptionsrate zu erreichen, ist eine Dissoziation der DNA-Histon-Bindungen Voraussetzung. Es wird zwar, wie anhand der histochemischen Reaktionen in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden konnte, unter dem hormonellen Einfluß mehr DNA "frei" zur Transkription, aber der Gesamtgehalt an DNA bleibt konstant. Beweisend für den unter Hormonzufuhr unveränderten DNA-Gehalt der Leberzellkerne sind die aufgeführten zytophotometrischen Werte nach der Feulgen-Nukleal-Reaktion (NOESKE, 1968, 1969; MÜLLER, 1966; LEDERER und SANDRITTER, 1966). Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den hormonstimulierten Tieren liegen die ermittelten zytophotometrischen Meßwerte für die Feulgen-Nukleal-Reaktion bei Leberzellen wie auch bei den als Referenzzellen gewählten homologen Lymphozyten auf gleichem Niveau.

Dem Verlauf der Acridinorange-Farbstoffbindungskurven nach Hormonapplikation gehen Änderungen der Farbstoffbindungskapazitäten des DNP für den Farbstoff Phenanthrenchinon parallel, der nach MAGUN und KELLY (1969) und YAMADA und ITANO (1966) spezifisch die Guanidinogruppen der Argininresiduen im Nukleoproteidkomplex markiert. Nach BUSCH (1965) sind die DNA-PO₄-Gruppen im Chromatin an der Ausübung ihrer genetischen Aktivität durch Blockierung durch die Guanidinogruppen der speziell in den Histonen lokalisierten Argininresiduen gehindert. Dieser inhibitorische Effekt der Histone auf

die DNA (JOHNS, 1972; HOARE und JOHNS, 1971; SLUYSER et al, 1965) kann nur durch Aufspaltung der Bindungen zwischen DNA- PO_4 -Gruppen und argininreichen Histonen verringert werden. Nach Aufspaltung dieser Bindung unter Hormonstimulierung stehen nun die aus der Bindung gelösten Guanidinogruppen in größerem Maße für eine Bindung mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon zur Verfügung. Je höher die Hormonzufuhr gewählt wird, umso mehr Guanidinogruppen werden von der DNA gelöst und gehen eine Reaktion mit Phenanthrenchinon ein, wie die im Ergebnisteil dargestellte ansteigende Farbstoffbindungskurve für das PQ dokumentiert. Die Änderung der Farbstoffbindungskapazität des DNP für das PQ beruht nicht auf einer hormoninduzierten gesteigerten Synthese argininreicher Histone, wie anhand der Fastgreen-FCF-Färbung nachgewiesen werden konnte (ALFERT und GESCHWIND, 1953; LEDERER und SANDRITTER, 1966). Diese Färbung gibt den Gesamtgehalt der Leberzellkerne an Histonen an, und sie erlaubt zusammen mit den Ergebnissen der Feulgen-Nukleal-Reaktion die Aussage, daß unter Östrogenstimulation das Verhältnis Histone / DNA konstant bleibt (COHEN et al, 1964), wobei weder für die DNA noch für die Histone ein hormoninduzierter Syntheseanstieg nachgewiesen werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse der zytochemischen Reaktionen berechtigen dazu, Östradiol-induzierte Veränderungen der Farbstoffbindungskapazität des DNP der Rattenleber auf der Ebene der Transkription zu diskutieren. Vermutlich kommt es unter Hormoneinfluß im DNP zu einer vermehrten Dissoziation der Bindungen zwischen den DNA- PO_4 -Gruppen und den Guanidinogruppen der argininreichen Histone, welche histochemisch mit dosisabhängigen, gesteigerten Farbstoffbindungskapazitäten der beiden, diese Gruppen spezifisch markierenden Farbstoffe nachweisbar ist. Durch eine Dissoziation der erwähnten Gruppen steht nun mehr DNA für die Transkription zur Verfügung. Zur Klärung der Frage,

auf welche Art und Weise es im Einzelnen zur Sprengung der Bindungen zwischen DNA- PO_4 -Gruppen und Guanidinogruppen kommt, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an:

Zum einen könnte eine unter Hormoneinfluß eintretende strukturelle Veränderung der argininreichen Histone in Frage kommen, wobei es sich um eine Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung handeln dürfte. Durch den Strukturwandel der Histone wird ihre Bindung zur DNA reversibel gelockert bzw. aufgespalten, sodaß die DNA nun frei ist zur Transkription.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, über eine Steigerung der Syntheserate für saure Nicht-Histon-Proteine die histonbedingte Repression der DNA zu beeinflussen. Diese Proteingruppe neigt in vitro zur Komplexbildung mit Histonen verschiedener Fraktionen (HAMILTON, 1963; TENG und HAMILTON, 1969). Im Anschluß an eine Östradiol-induzierte, gesteigerte Synthese saurer Nicht-Histon-Proteine (TENG und HAMILTON, 1969; LÖHR, 1973) könnte eine vermehrte Bindung dieser sauren Proteine an die Histone erfolgen, wodurch diese aus ihrer Bindung an die DNA verdrängt würden (KAMIYAMA und WANG, 1971; SPELSBERG und HNILICA, 1969 b; SHEEHAN und OLINS, 1974; GILMOUR und PAUL, 1969; PAUL und GILMOUR, 1968).

Eine weitere Möglichkeit, über die eine hormoninduzierte Steigerung der Matrizenaktivität des Chromatins ausgelöst werden kann, besteht in der direkten Anlagerung der Rezeptorprotein-Hormonkomplexe an die Chromatinstrukturen des Zellkerns. Das Hormon verändert die Chromatinstruktur, indem es die Wechselwirkungen zwischen DNA, Histonen und sauren Proteinen untereinander angreift. Der negativ geladene Hormon-Rezeptorkomplex soll, entweder an saure Proteine oder an die DNA gebunden, in einer unspezifischen Wechselwirkung mit den benachbarten, positiv geladenen Histonproteinen stehen (KING et al, 1969). Dabei

sollen die Histone von der DNA abgedrängt werden, sodaß diese für die Transkription genetischer Information zur Verfügung steht.

Eine endgültige Antwort auf die Frage, welcher Baustein des DNP Reaktionspartner des Rezeptor-Hormonkomplexes ist, und welcher Art die Wechselwirkungen zwischen DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen sind, kann anhand der hier durchgeführten fluoreszenzzytometrischen Untersuchungen jedoch nicht gegeben werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Östradiolbenzoat zeichnet sich durch einen hohen Hepatotropismus aus. Zur Wirkungsentfaltung an den Funktionsstrukturen des Zellkerns bedarf das Hormon eines komplexen, makromolekularen zytoplasmatischen und nukleären Rezeptor-Transportsystems. Unter Hormonstimulierung wird nach einer verstärkten Akkumulation sog. saurer Kernproteine und Acetylierung sog. argininreicher Histone eine de-novo-Biosynthese verschiedener RNA- und Proteinfractionen mit einer Aktivitätssteigerung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase beobachtet.

Nach Östradiolapplikation wird an den Leberzellkernen männlicher und weiblicher Ratten eine dosisabhängige Steigerung der Farbstoffbindungskapazität des DNP für Acridinorange und Phenanthrenchinon nachgewiesen, was auf eine hormoninduzierte Dissoziation der DNA-Histon-Bindungen zurückgeführt werden könnte. Die Feulgen- und Fastgreen-Werte bleiben unter hormoneller Stimulierung konstant, womit bewiesen wird, daß die gesteigerten Farbstoffbindungskurven für Acridinorange und Phenanthrenchinon nicht auf einer Zunahme des nukleären DNA- und Histongehaltes beruhen.

Die zytophotometrischen Ergebnisse bestätigen die Annahme eines primären Angriffpunktes des Östradiol auf der Transkriptionsebene. Im Einzelnen werden drei Möglichkeiten, die Matrizenaktivität der DNA zu beeinflussen, diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALFERT, M., GESCHWIND, J.J.: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 39, 991 - 999 (1953)
2. ANDERSON, N.O., GORSKI, J.: The effect of estrogen on synthesis and acetylation of histones in rat uteri.
Fed. Proc. 30, 361 Abs (1971)
3. ARIAS, F., WARREN, J.C.: An estrophilic macromolecule in chicken liver cytosol.
Biochim. Biophys. Acta 230, 550 - 559 (1971)
4. BALHORN, R., CHALKLEY, R., GRANNER, D.: Lysine-rich histone phosphorylation. A positive correlation with cell replication.
Biochemistry 11, 1094 - 1098 (1972)
5. BEATO, M., KALIMI, M., KONSTAM, M., FEIGELSON, P.: Interactions of glucocorticoids with rat liver nuclei. Studies on the nature of the cytosol transfer factor and the nuclear acceptor site.
Biochemistry 12, 3372 - 3379 (1973)
6. BILLING, R.J., BARBIROLI, B., SMELLIE, R.M.S.: The mode of action of oestradiol. I.: The transport of RNA precursors into the uterus.
Biochim. Biophys. Acta 190, 52 - 59 (1969a)

7. BILLING, R.J., BARBIROLI, B., SMELLIE, R.M.S.:
The mode of action of oestradiol. II.: The synthesis of RNA.
Biochim. Biophys. Acta 190, 60 - 65 (1969b)
8. BÖHM, N., SPRENGER, E.: Fluorescence cytophotometry:
A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA.
Histochemie 16, 100 - 118 (1968)
9. BRAIDMAN, I.P., ROSE, D.P.: Effects of sex hormones on
three glucocorticoid-inducible enzymes concerned with amino acid metabolism in rat liver.
Endocrinology 89, 1250 - 1255 (1971)
10. BUCKINGHAM, R.H., STOCKEN, L.A.: Histone F₁. Purification and phosphorus content.
Biochim. J. 117, 157 - 160 (1970)
11. BUSCH, H.: Histones and other nuclear proteins.
Academic Press New York London, S. 1 - 137 (1965)
12. CHURCH, R.B., MC CARTHY, B.J.: Unstable nuclear RNA synthesis following estrogen stimulation.
Biochim. Biophys. Acta 199, 103 - 114 (1970)
13. CLARK, J.H., GORSKI, J.: Estrogen receptors: An evaluation of cytoplasmic - nuclear interactions in a cell-free system and a method for assay.
Biochim. Biophys. Acta 192, 508 - 515 (1969)

14. COHEN, S.N., SPICER, S.S., YIELDING, K.L.: Observations on the histone / DNA ratio of the immature rabbit uterus following administration of estrogen.
Biochim. Biophys. Acta 87, 511 - 514 (1964)
15. COOLSMA, J.W.T., GRUBER, M.: RNA synthesis in rooster liver.
Biochim. Biophys. Acta 169, 306 - 315 (1968)
16. COX, R.F., HAINES, M.E., CAREY, N.H.: Modification of the template capacity of chick-oviduct chromatin for form B-RNA-polymerase by estradiol.
Eur. J. Biochem. 32, 513 - 524 (1973)
17. DARZYNKIEWICZ, Z., BOLUND, L., RINGERTZ, N.R.: Nucleoprotein changes and initiation of RNA synthesis in PHA stimulated lymphocytes.
Exptl. Cell Res. 56, 418 - 424 (1969b)
18. DATI, F.A., MAURER, H.R.: Estradiol-mediated template activity of mouse and rat uterine chromatin: An unsolved problem.
Biochim. Biophys. Acta 246, 589 - 595 (1971)
19. DENKHAUS, W., HEIMER, D.: Mikrofluorometrische Bestimmungen der freien DNS-PO₄-Gruppen im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meerschweinchen.
Gerontologia 16, 1 - 13 (1970)

20. EPIFANOVA, O.I.: Mitotic cycles in estrogen-treated mice:
A radioautographic study.
Exptl. Cell Res. 42, 562 - 577 (1966)
21. FRENSTER, J.H.: Nuclear polyanions as de-repressors of
ribonucleic acid.
Nature 206, 680 - 683 (1965)
22. GALLWITZ, D.: Histone methylation.
Arch. Biochim. Biophys. 245, 650 - 657 (1971)
23. GALLWITZ, D., SEKERIS, C.E.: The acetylation of histones
of rat liver nuclei in vitro by acetyl-CoA Hoppe-
Seylers Z. phys. Chem. 350, 150 - 154 (1969)
24. GARDNER, D.G., WITLIFF, J.L.: Specific estrogen recep-
tors in the lactating mammary gland of the rat.
Biochemistry 12, 3090 - 3096 (1973)
25. GILMOUR, R.S., PAUL, J.: RNA transcribed from recon-
stituted nucleoprotein is similar to natural RNA.
J. Mol. Biol. 40, 137 - 139 (1969)
26. GLASSER, S.R., CHYTIL, F., SPELSBERG, T.C.: Early
effects of oestradiol-17 β on the chromatin and
activity of the DNA-dependent RNA polymerases
(I and II) of the rat uterus.
Biochem. J. 130, 947 - 957 (1972)

27. GOPALAKRISHNAN, T.V., SADGOPAL, A.: Partial purification of cortisol-binding protein from rat liver cytosol and its role in transcription.
Biochim. Biophys. Acta 287, 164 - 186 (1972)
28. GREENGARD, O., GORDON, M., SMITH, M.A., ACS, G.: Studies on the mechanism of diethylstilbestrol-induced formation of phosphoprotein in male chickens.
J. biol. Chem. 239, 2079 - 2082 (1964)
29. GREENGARD, O., SENTENAC, A., ACS, G.: Induced formation of phosphoprotein in tissues of cockerels in vivo and in vitro.
J. biol. Chem. 240, 1687 - 1691 (1965)
30. GREENMAN, D.L., WICKS, W.D., KENNEY, F.T.: Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones.
J. biol. Chem. 240, 4420 - 4426 (1965)
31. GROVER, A., SUNDHARADAS, G., TALWAR, G.P.: Regulations of serine transfer ribonucleic acid during oestrogen-induced synthesis of phosphovitin in rooster liver.
Biochem. J. 128, 6P (1972)
32. GSCHWENDT, M., KITSTEIN, W.: Specific binding of estradiol to the liver chromatin of estrogenized roosters.
Biochim. Biophys. Acta 361, 84 - 96 (1974)

33. GUSTAFSSON, J., INGELMAN-SUNDBERG, M.: Age-dependent induction and repression of rat liver microsomal hydrosylase systems by estradiol. *Biochim. Biophys. Acta* 354, 172 - 181 (1974)
34. HAHN, W.E., SCHJEIDE, O.A., GORBMAN, A.: Organ-specific estrogen-induced RNA synthesis resolved by DNA-RNA hybridization in the domestic fowl. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 62, 112 - 119 (1969)
35. HAMILTON, T.H.: Isotopic studies on estrogen-induced acceleration of ribonucleic acid and protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 49, 373 - 379 (1963)
36. HAMILTON, T.H.: Control by estrogen of genetic transcription and translation. *Science* 161, 649 - 661 (1968)
37. HAMILTON, T.H., TENG, C.S., MEANS, A.R.: Early estrogen action: Nuclear synthesis and accumulation of protein correlated with enhancement of 2 DNA-dependent RNA-polymerase activities. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 59, 1265 - 1272 (1968a)
38. HAMILTON, T.H., WIDNELL, C.C., TATA, J.R.: Sequential stimulations by oestrogen of nuclear RNA synthesis and DNA-dependent RNA-polymerase activities in rat uterus. *Biochim. Biophys. Acta* 108, 168 - 172 (1965)

39. HAMILTON, T.H., WIDNELL, C.C., TATA, J.R.: Synthesis of ribonucleic acid during early estrogen action. J. biol. Chem. 243, 408 - 417 (1968b)
40. HARBERS, E.: Nukleinsäuren.
G. Thieme Verlag Stuttgart 1969
41. HARRIS, G.S.: Nature of oestrogen specific binding sites in the nuclei of mouse uteri.
Nature 231, 246 - 248 (1971)
42. HEINE, H.: Der Ultrapack
Z. wiss. Mikr. 48, 450 - 465 (1931)
43. HILL, P., DVORNIK, D.: Agents affecting lipid metabolism. Separation of rat serum lipoproteins with dextran sulfate.
Can. J. Biochem. 47, 1043 - 1047 (1969)
44. HOARE, T.A., JOHNS, E.W.: The inhibition of RNA-synthesis by histones.
Biochim. Biophys. Acta 247, 408 - 411 (1971)
45. JACOB, F.: MONOD, J.: Genetic regulatory mechanism in the synthesis of protein.
J. molec. Biol. 3, 318 - 356 (1961)
46. JAILKHANI, B., TALWAR, G.P.: Induction of phosphatidylserine synthesis in chicken liver by oestrogens: Evidence for gene duplication.
Biochem. J. 128, 66P-67P (1972)

47. JENSEN, E.V., SUZUKI, T., KAWASHIMA, T., STUMPF, W.E., JUNGBLÜT, P.W., DE SOMBRE, E.R.; A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 59, 632 - 638 (1968)
48. JOHNS, E.W.: Histones, chromatin structure and RNA synthesis.
Nature New Biol. 237, 87 - 88 (1972)
49. KAMIYAMA, M., WANG, T.Y.: Activated transcription from rat liver chromatin by non-histone proteins.
Biochim. Biophys. Acta 228, 563 - 576 (1971)
50. KARLSON, P., SEKERIS, C.E.: Wirkungsmechanismus der Steroidhormone.
Dtsch. med. Wschr. 98, 831 - 835 (1973)
51. KILLANDER, D., RIGLER, R.: Activation of deoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohemagglutinin.
Exptl. Cell Res. 54, 163 - 170 (1969)
52. KING, R.J.B., GORDON, J., STEGGLES, A.W.: The properties of a nuclear acidic protein fraction that binds (6, 7-³H) oestradiol-17 β .
Biochem. J. 114, 649 - 657 (1969)
53. KLYDE, B.J., BERNFIELD, M.R.: Rate of serine transfer ribonucleic acid synthesis during estrogen-induced phosphoprotein synthesis in chick liver.
Biochemistry 12, 3757 - 3763 (1973)

54. KÜHNAU, J.: Physiologie und Biochemie der endokrinen Regulationen und Korrelationen.
In: Hdb. allg. Path. Bd. VIII/1, 107 ff. (1971)
55. LANGAN, T.A., SMITH, L.K.: Phosphorylation of histones and protamines by a specific protein kinase from liver.
Fed. Proc. 26, 603 (1967)
56. LEDERER, B., SANDRITTER, W.: Sukzedane zytophotometrische Bestimmung von Desoxyribonukleinsäure. Histon und Gesamtprotein.
Histochemie 7, 288 - 290 (1966)
57. LIBBY, P.R.: Estrogen stimulation of histone acetylation in uterus.
Fed. Proc. 30, 361 (1971)
58. LIBBY, P.R.: Histone acetylation and hormone action. Early effects of oestradiol-17 β on histone acetylation in rat uterus.
Biochem. J. 130, 663 - 669 (1972)
59. LING, N.R., KAY, J.E.: Gene activation.
In: Lymphocyte stimulation,
North Holland Publishing Company, Amsterdam,
Oxford S. 279 - 286 (1975)
60. LÖHR, J.: ACTH-induzierter Strukturwandel des Nukleoproteid-komplexes von Leberzellkernen junger und alter Ratten.
Gerontologia 18, 113 - 121 (1972)

61. LÖHR, J.: Fluoreszenzzytometrische Untersuchungen zum Wirkungsprinzip der Hormone Hydrocortison, Oestradiol, Trijodthyronin und Glucagon an Rattenleberzellkernen.
Habil.-Schrift Mainz 1973
62. LÖHR, J., MÜLLER, W.E.G., ZAHN, R.: The influence of hydrocortisone acetate on the course of phenanthrenquinone reaction during the RNA-synthesis in the interphase nuclei from rat liver cells.
10.th Int. Congr. Int. Acad. Path.: Postcongress symposium "DNA and Pathology"
Freiburg/Brsg. 22.9.1974a
63. LÖHR, J., MÜLLER, W.E.G.: Zur Kinetik der Acridinorange-Reaktion bei der Cortison-induzierten RNA-Biosynthese in der Rattenleber.
XVII. Symposium der deutschen Gesellschaft für Histochemie, Bozen/Italien 5.10.1974b
64. LÖHR, J., MÜLLER, W.E.G.: Zum Einfluß des Trijodthyronin auf die RNA-Biosynthese in der Rattenleber.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 58, 561 (1974c)
65. LUCK, D.N., HAMILTON, T.H.: Early estrogen action: Stimulation of the metabolism of high molecular weight and ribosomal RNA s.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 157-161 (1972)

66. MAGUN, B.E., KELLY, J.W.: A new fluorescent method with phenanthrenquinone for the histochemical demonstration of arginine residues in tissues.
J. Histochem. Cytochem. 17, 821 - 827 (1969)
67. MESTER, J., BAULIEU, E-M.: Nuclear estrogen-receptor of chick liver.
Biochim. Biophys. Acta 261, 236 - 244 (1972)
68. MUELLER, G.C., GORSKI, J., AIZAWA, Y.: The role of protein synthesis in early estrogen action.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 164 - 169 (1961)
69. MÜLLER, D.: Erfahrungen mit der Feulgenfärbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen.
Histochemie 7, 96 - 102 (1966)
70. MÜLLER, W.E.G., LÖHR, J., ZAHN, R.: Biochemical and cytophotometrical determination of the "free DNA-PO₄-groups" in interphase nuclei from rat liver during induction of RNA-synthesis by triiodothyronine.
10.th Int. Congr. Int. Acad. Path.: Postcongress symposium "DNA and Pathology"
Freiburg/Brsg. 22.9.1974a
71. MÜLLER, W.E.G., TOTSUKA, A., NUSSER, J., OBERMEIER, J., RHODE, H.J., ZAHN, R.K.: Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase in quail oviduct. Changes during estrogen and progesterone induction.
Nucleic Acids Res. 1, 1317 - 1327 (1974b)

72. MÜLLER, W.E.G., TOTSUKA, A., ZAHN, R.K.: Association of an estradiol receptor with the DNA-dependent RNA-polymerase I from immature quail oviduct. *Biochem. Biophys. Acta* 366, 224 - 233 (1974c)
73. MUSLINER, T.A., CHADER, G.J.: Estradiol-receptors of the rat uterus: Interaction of the cytoplasmic estrogen-receptor with DNA in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 262, 256 - 263 (1972)
74. O' MALLEY, B.W., SPELSBERG, T.C., SCHRADER, W.T., CHYTIL, F., STEGGLES, A.W.: Mechanisms of interaction of a hormone-receptor complex with the genome of a eukaryotic target cell. *Nature* 235, 141 - 144 (1972)
75. NOESKE, K.: Die Zusammensetzung der Zellkernproteine und ihre Beziehung zum DNS-Gehalt der normalen Myelo- und Erythropoese beim Menschen. *Habil.-Schrift Gießen* 1968
76. NOESKE, K.: Diskrepanzen von Feulgen-Wert und DNS-Gehalt. *Histochemie* 20, 322 - 327 (1969)
77. PALMITER, R.D.: Regulation of protein synthesis in chick oviduct. *J. biol. Chem.* 247, 6450 - 6461 (1972)
78. PAUL, J., GILMOUR, R.S.: Organ-specific restriction of transcription in mammalian chromatin. *J. Mol. Biol.* 34, 305 - 316 (1968)

79. POGO, B.G.T., POGO, A.O., ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E.: Changing patterns of histone acetylation and RNA synthesis in regeneration of the liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 59, 1337-1344 (1968)
80. PUCA, G.A., NOLA, E., SICA, V., BRESCIANI, F.: Estrogen-binding proteins of calf uterus. Interrelationship between various forms and identification of a receptor-transforming factor. *Biochemistry* 11, 4157 - 4165 (1972)
81. RENNIE, P., BRUCHOVSKY, N.: Studies on the relationship between androgen receptors and the transport of androgens in rat prostate. *J. biol. Chem.* 248, 3288 - 3297 (1973)
82. RIGLER, jr, R.: Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridinorange. *Acta physiol. scand.* 67, suppl. 267, 1-123 (1966)
83. RIGLER, R., KILLANDER, D., BOLUND, L., RINGERTZ, N.R.: Cytochemical characterization of desoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei. *Exptl. Cell Res.* 55, 215 - 224 (1969)
84. RINGERTZ, N.R., BOLUND, L., DARZYNKIEWICZ, Z.: AO binding of intracellular nucleic acids in fixed cells in relation to cell growth. *Exptl. Cell Res.* 63, 233 - 240 (1970b)

85. ROY, A.K., MILIN, B.S., Mc MINN, D.M.: Androgen-receptor in rat liver: Hormonal and developmental regulation of the cytoplasmic receptor and its correlation with the androgen-dependent synthesis of α_{2u} -globulin.
Biochim. Biophys. Acta 354, 213 - 232 (1974)
86. RUSSEV, G., VENKOV, C., TSANEV, R.: Stepwise dissociation of histones from rat liver chromatin in alkaline solutions.
Eur. J. Biochem. 43, 253 - 256 (1974)
87. SANDRITTER, W.: Funktionsstrukturen des Zellkerns.
Med. Welt 1, 1 - 10 (1970)
88. SCHULTZ, G.: Die Bedeutung von cyclischem AMP bei Hormonwirkungen.
Der Internist 13, 159 - 166 (1972)
89. SEGAL, S.J., DAVIDSON, O.W., WADA, K.: Role of RNA in the regulatory action of estrogen.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 782 - 787 (1965)
90. SESHADRI, B., WARREN, J.C.: Estrone stimulation of RNA synthesis in uterine nuclear preparations.
Biochim. Biophys. Acta 195, 566 - 568 (1969)
91. SHEEHAN, D.M., OLINS, D.E.: The binding of nuclear non-histone protein to DNA.
Biochim. Biophys. Acta 353, 438 - 446 (1974)

92. SHIED, B., BILIK, E., BIEMPICA, L.: Estrogen-mediated enhancement of rat liver sRNA methylase activity.
Arch. Biochem. Biophys. 140, 437 - 442 (1970)
93. SHIH, T.Y., FASMAN, G.D.: Circular dichroism studies of histone-desoxyribonucleic acid complexes. A comparison of complexes with histone I(f₁), histone IV (f_{2a1}) and their mixtures.
Biochemistry 11, 398 - 404 (1972)
94. SLUYSER, M., THUNG, P.J., EMMELOT, P.: Inhibition of desoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rat liver by the administration of histones in vivo.
Biochim. Biophys. Acta 108, 249 - 258 (1965)
95. SPELSBERG, T.C., HNILICA, L.S.: Studies on the RNA polymerase - histone complexes.
Biochim. Biophys. Acta 195, 55 - 62 (1969a)
96. SPELSBERG, T.C., HNILICA, L.S.: The effects of acidic proteins and RNA on the histone inhibition of the DNA-dependent RNA-synthesis in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 195, 63 - 75 (1969b)
97. SPELSBERG, T.C., STEGGLES, A.W., CHYTIL, F., O' MALLEY, B.W.: Progesterone-binding components of chick oviduct.
J. biol. Chem. 247, 1368 - 1374 (1972)

98. SPELSBERG, T.C., TANKERSLEY, S., HNILICA, L.S.:
The interaction of RNA-polymerase with
histones.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 62, 1218 - 1225
(1969)
99. STANCEL, G.M., LEUNG, K.M.T., GORSKI, J.: Estrogen
receptors in the rat uterus. Multiple forms
produced by concentration-dependent aggregation.
Biochemistry 12, 2130 - 2136 (1973a)
100. STANCEL, G.M., LEUNG, K.M.T., GORSKI, J.: Estrogen
receptores in the rat uterus. Relationship between
cytoplasmic and nuclear forms of the
estrogen binding protein.
Biochemistry 12, 2137 - 2141 (1973b)
101. TALWAR, P.G., SEGAL, S.J., EVANS, A., DAVIDSON, O.W.:
The binding of estradiol in the uterus: A mechanism
for derepression of RNA-synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 52, 1059 - 1066
(1964)
102. TENG, C.S., HAMILTON, T.H.: Role of chromatin in estrogen
action in the uterus. II. Hormone-induced synthesis
of nonhistone acidic proteins which restore
histone-inhibited DNA-dependent RNA-synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 63, 465 - 472
(1969)

103. VONDERHAAR, B.K., KIM, U.H., MUELLER, G.C.: The heterogeneity of soluble estrogen receptors from rat uteri and their modification by temperature, imidazole compounds and estradiol.
Biochim. Biophys. Acta 208, 517 - 527 (1970)
104. WALLACE, R.A., JARED, D.W.: Estrogen induces lipoprophoprotein in serum of male xenopus laevis.
Science 160, 91 - 92 (1968)
105. WALLACE, R.A., JARED, D.W.: Studies on amphibian yolk. The estrogen-induced hepatic synthesis of a serum lipophosphoprotein and its selective uptake by the ovary and transformation into yolk platelet proteins in xenopus laevis.
Develop. Biol. 19, 498 - 526 (1969)
106. WEINSTEIN, J., SELTZER, M., BELITSKY, R.: The interaction of glucagon and gonadectomy upon hepatic triglyceride metabolism in rats.
Biochim. Biophys. Acta 348, 14 - 22 (1974)
107. WEISBECKER, L.: Hormone
In: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie
von W.D.KEIDEL, S. 191 - 218
G. Thieme Verlag Stuttgart 1970
108. WICKS, W.D., GREENMAN, D.L., KENNEY, F.T.: Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones.
J. biol. Chem. 240, 4414 - 4419 (1965)

109. WILLIAMS, D., GORSKI, J.: Preparation and characterization of free cell suspensions from immature rat uterus.
Biochemistry 12, 297 - 306 (1973)
110. WITLIFF, J.L., KENNEY, F.T.: Changes in hepatic RNA-synthesis associated with synthesis of yolk proteins in xenopus males given estrogen.
Fed. Proc. 28, 729 (1969)
111. WITLIFF, J.L., KENNEY, F.T.: Regulation of yolk protein synthesis in amphibian liver. I.: Induction of lipovitellin synthesis by estrogen.
Biochim. Biophys. Acta 269, 485 - 492 (1972)
112. WITLIFF, J.L., LEE, K.-L., KENNEY, F.T.: Regulation of yolk protein synthesis in amphibian liver. II.: Elevation of ribonucleic acid synthesis by estrogen.
Biochim. Biophys. Acta 269, 493 - 504 (1972)
113. WYSS, R.H., HEINRICHS, W.L., HERRMANN, W.L.: Some species differences of uterine estradiol receptors.
J. clin. Endocr. 28, 1227 - 1230 (1968)
114. YAMADA, S., ITANO, H.A.: Phenanthrenquinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines.
Biochim. Biophys. Acta 130, 538 - 540 (1966)

115. ZICCARDI, R., SCHUMAKER, V.: Interaction of histone f_{2a1}
with T7 desoxyribonucleic acid.
Cooperativity of histone binding.
Biochemistry 12, 3231 - 3235 (1973)

Lebenslauf

Am 15. November 1948 wurde ich als erstes Kind des Schmiedes Nikolaus Hoffmann und seiner Ehefrau Helene, geb. Kersch, in Trier geboren.

Von Ostern 1955 bis Ostern 1960 besuchte ich die Volksschule in Metzdorf, daran anschließend das Neusprachliche Gymnasium der Ursulinen in Trier, wo ich am 8. Juni 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, wo ich nach 2 Semestern die naturwissenschaftliche, nach weiteren 3 Semestern die ärztliche Vorprüfung ablegte. Die ärztliche Prüfung bestand ich am 12. Juni 1974 in Mainz.

Am 1. September 1974 trat ich meine Medizinalassistentenzeit an, von der ich 4 Monate in der II. Med. Universitätsklinik Mainz und 4 weitere Monate in der Chirurgischen Universitätsklinik Mainz tätig war. Seit dem 1. Mai 1975 arbeite ich als Medizinalassistentin in der Universitätskinderklinik Mainz.

Seit dem 16. August 1974 bin ich mit dem Medizinalassistenten Klaus-Dieter Witek verheiratet.

Herrn Prof. Dr. med. J. Löhr bin ich zu großem Dank für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und für seine hilfreiche Unterstützung bei der Bearbeitung verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller danke ich für die freundliche Ausarbeitung des Korreferates.

Herrn Diplom-Mathematiker Mau aus dem Institut für Statistik und Dokumentation der Johannes Gutenberg-Universität Mainz danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Bearbeitung dieser Untersuchung.

